



# Etude de deux protéines impliquées dans l'injection de toxines par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*

Caroline Perdu

## ► To cite this version:

Caroline Perdu. Etude de deux protéines impliquées dans l'injection de toxines par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : . tel-01145014

**HAL Id: tel-01145014**

**<https://theses.hal.science/tel-01145014>**

Submitted on 23 Apr 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Virologie, Microbiologie, Immunologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Mlle Caroline PERDU**

Thèse dirigée par **Mme Ina ATTREE**  
et codirigée par **M Eric FAUDRY**

préparée au sein du **Laboratoire de Biologie du Cancer et de l'Infection**  
dans **l'École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

# Etude de deux protéines impliquées dans l'injection de toxines par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*

Thèse soutenue publiquement le **4 juin 2013**,  
devant le jury composé de :

**Mme Ariel BLOCKER**

Principal Investigator, Bristol, Angleterre, Rapporteur

**M Vladimir SHEVCHIK**

Directeur de Recherche, Lyon, France, Rapporteur

**Mme Anne IMBERTY**

Directeur de Recherche, Grenoble, France, Examineur

**M Guillaume MONDESERT**

PhD, Toulouse, France, Examineur

**Mme Ina ATTREE**

Directeur de Recherche, Grenoble, France, Directeur de thèse

**M Eric FAUDRY**

Chercheur, Grenoble, France, Co-encadrant de thèse





*A mes grands-parents,*

*A mes parents et à ma Vané,*

*A Stéphane.*





## **Remerciements**

Je tiens tout d'abord à remercier le CEA, qui a financé ce projet de recherche pendant trois ans.

J'adresse également mes remerciements à François Boulay qui m'a accueillie tout d'abord dans son laboratoire « Biologie et Biophysique des Systèmes Intégrés ». L'équipe a ensuite intégré le laboratoire « Biologie du Cancer et de l'Infection », et l'accueil des doctorants y est toujours chaleureux : merci à son directeur Jean-Jacques Feige.

Je ne sais comment remercier Eric Faudry, mon encadrant de thèse, pour tout ce qu'il m'a appris, pour son côté ingénieux et bricoleur, pour son optimisme et pour sa gentillesse, pour sa réactivité. Toutes nos discussions m'ont permis de mieux appréhender les différents aspects du sujet et de mener à bien ce travail. Mille mercis !

Je remercie bien sûr ma directrice de thèse, Ina Attrée, pour sa disponibilité, mais aussi pour ses conseils avisés et son dynamisme, qui ont été très importants pour dépasser les obstacles et atteindre les objectifs.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe « Pseudo » que je n'ai pas encore cités, et en particulier à Sylvie et Mylène pour leur aide en biologie moléculaire, François pour son initiation à la mesure du taux d'injection de toxines, Philippe et Stéphanie pour les statistiques et les « manip souris », Michel pour les nombreux avis techniques. Merci à tous de m'avoir aidée et soutenue pendant la thèse, mais aussi pour tous les moments que nous avons partagés : les discussions, scientifiques ou pas, au laboratoire ou autour d'une table, les footings, les sorties « montagne »... Je n'oublierai pas tous ces moments ! Vos qualités respectives et votre sympathie ont rendu ces années de thèse bien agréables.

Je voudrais aussi remercier Marie-Pierre, dont l'aide a été indispensable pour gérer tout l'aspect administratif des déplacements, formations et soutenance de thèse. Merci également à Claire pour son aide dans la préparation des milieux de culture bactériens.

Merci à toutes les personnes qui, à travers des collaborations scientifiques, ont contribué à l'avancée des travaux de thèse, Daphna Flenel et Guy Schoen pour l'observation de mes fractions partiellement purifiées d'ATPase en microscopie électronique, Marie-Odile Fauvarque et Perrine pour leur initiation aux infections de drosophiles, Véronique Collin Faure pour le passage de mes cellules infectées en cytométrie de flux, Yohann Coute et Alexandra Kraut pour les analyses de spectrométrie de masse. Je remercie tout particulièrement les collaborateurs de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble, Andréa Dessen, Thierry Izoré et Viviana Job, pour tous les échanges scientifiques et la caractérisation structurale de ExsB.

Je tiens à remercier mes rapporteurs, pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de mon manuscrit ainsi que tous les membres du jury, qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon travail de thèse.

Je voudrais également remercier Andréa Dessen et Ariel Blocker pour tous les conseils et leurs discussions lors des comités de suivi de thèse, cela m'a bien aidée dans l'avancement de mon travail. Un merci tout particulier à Ariel Blocker, qui m'a accueillie dans son laboratoire à Bristol et m'a fait découvrir le monde de la microscopie électronique.

Merci beaucoup aux deux autres « drôles de dames » de l'équipe, Guille et Mayebine, qui sont devenues des amies au cours de ces trois années. Les bavardages pendant les temps d'attente de centrifugation, les conseils techniques, leur soutien moral, les « Tupperware party » qui nous détendaient bien le midi, les sorties ciné, ... ont agrémenté la vie à Grenoble. Je n'oublie pas non plus Sarah, « la fille du couloir », qui se joignait souvent à nous ! Les petites pauses thé-café et les sorties restau vont me manquer. Merci également à tous les jeunes que j'ai eu le plaisir de rencontrer au cours de la thèse : Laura et Amandine, qui ont participé à la mise au point de certaines méthodologies utilisées pour mon travail, Valentina, Carinne, Guillaume, Bakhos, Laura, Cédric et tous les autres, pour les bons moments passés ensemble et leur bonne humeur.

Je remercie chaleureusement Perrine, Florie, Laurence et Mathieu du Comité d'Animation Scientifique, avec qui j'ai été ravie d'organiser les séminaires jeunes chercheurs de l'institut et la journée thématique « Hôtes-Pathogènes », pour leur gentillesse et leur amitié.

Merci également aux amis du sud ouest retrouvés avec beaucoup de joie sur Grenoble, Marie-Line et Nico, pour tous les bons moments que nous avons partagés.

Merci à mes amis du groupe « INSA », Hélène, Olivier, Camille, Aurélie, Clément, Anne, Dimitri, Anne-Lise, Amandine, Rémi, et les autres pour leurs encouragements, et pour les joyeuses retrouvailles organisées régulièrement pour mon plus grand bonheur.

Je ne pourrai jamais assez remercier mes parents, ma sœur « ma Vané » (et son Thomas), et mes grands-parents, qui m'ont toujours soutenue et accompagnée dans mes projets. Ils ont toujours été là pour moi pendant ces trois années de thèse, malgré la distance qui nous sépare. Je leur dois tout ce que je suis.

Enfin, je voudrais remercier du fond du cœur mon Stéphane, pour tout ce qu'il a fait pour moi au quotidien, pour ses soutiens permanents au cours de cette thèse, dans les bons moments comme dans les plus difficiles. Sa présence et son amour m'ont été indispensables.

# Table des matières

<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL .....</b>	<b>- 11 -</b>
<b>CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>- 17 -</b>
I. PSEUDOMONAS AERUGINOSA .....	- 19 -
A. <i>Description générale.....</i>	- 19 -
B. <i>Infections .....</i>	- 21 -
II. LES FACTEURS DE VIRULENCE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA .....	- 27 -
A. <i>Les facteurs de virulence à la surface bactérienne : rôle dans l'adhésion et la mobilité ..</i>	- 28 -
B. <i>Les facteurs de virulence sécrétés dans le milieu extracellulaire ou dans les cellules cibles : rôle dans la cytotoxicité et l'invasion bactérienne.....</i>	- 30 -
C. <i>Régulation des systèmes de virulence .....</i>	- 39 -
D. <i>Nouvelles stratégies thérapeutiques anti-infectieuses .....</i>	- 42 -
III. LE SYSTEME DE SECRETION DE TYPE III .....	- 43 -
A. <i>Origines du SST3 .....</i>	- 44 -
B. <i>L'assemblage du système .....</i>	- 46 -
C. <i>Importance du SST3 lors d'infections et enjeux thérapeutiques .....</i>	- 53 -
D. <i>Régulation et activation du SST3.....</i>	- 54 -
E. <i>Hiérarchie d'assemblage du SST3 .....</i>	- 55 -
IV. L'ATPASE DU SST3 .....	- 58 -
A. <i>Caractéristiques de l'ATPase du SST3 .....</i>	- 58 -
B. <i>L'ATPase est indispensable à l'activité du SST3 .....</i>	- 62 -
C. <i>Rôle potentiel de l'ATPase .....</i>	- 63 -
D. <i>Applications.....</i>	- 65 -
V. LA PROTEINE ExsB ET LE SST3 .....	- 66 -
A. <i>Localisation génétique de exsB .....</i>	- 66 -
B. <i>Homologies de ExsB avec des protéines de la famille des pilotines.....</i>	- 67 -
C. <i>Activité des pilotines.....</i>	- 68 -
D. <i>Rôle potentiel de ExsB dans le SST3 de Pseudomonas aeruginosa .....</i>	- 74 -
<b>CHAPITRE II : METHODOLOGIES MISES EN ŒUVRE .....</b>	<b>- 77 -</b>
I. CULTURES BACTERIENNES ET CULTURES CELLULAIRES.....	- 79 -
A. <i>Cultures bactériennes.....</i>	- 79 -
B. <i>Cultures cellulaires.....</i>	- 80 -
II. BIOLOGIE MOLECULAIRE : DELETION ET INTRODUCTION DE GENES D'INTERET CHEZ PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	- 81 -
A. <i>Plasmides et souches de départ .....</i>	- 82 -
B. <i>Purification d'ADN plasmidique : mini ou midi préparations .....</i>	- 86 -
C. <i>Analyse de l'ADN sur gel d'agarose ou d'acrylamide.....</i>	- 86 -
D. <i>Amplification des fragments d'ADN par PCR .....</i>	- 86 -
E. <i>Mutagenèse dirigée.....</i>	- 87 -
F. <i>Délétion d'un gène : la SOE PCR.....</i>	- 88 -
G. <i>Clonage du fragment d'intérêt dans un plasmide .....</i>	- 89 -
H. <i>Transformation dans E. coli puis dans P. aeruginosa.....</i>	- 90 -
I. <i>Insertion chromosomique par conjugaison triparentale .....</i>	- 91 -
J. <i>Vérification de la présence de la séquence d'ADN souhaitée.....</i>	- 92 -
III. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES PROTEINES .....	- 93 -
A. <i>Electrophorèse et Western blots .....</i>	- 93 -

B.	<i>Purification des anticorps dirigés contre ExsB</i> .....	- 95 -
C.	<i>Localisation des protéines d'intérêt</i> .....	- 96 -
D.	<i>Recherche des partenaires de la protéine ExsB</i> .....	- 99 -
E.	<i>Purification de l'ATPase PscN</i> .....	- 101 -
F.	<i>Analyse par spectrométrie de masse des protéines présentes dans différents échantillons</i> .....	- 105 -
G.	<i>Tests activité ATPase</i> .....	- 105 -
IV.	<b>ETUDE DE L'ACTIVATION ET DE L'ACTIVITE DU SST3</b> .....	- 105 -
A.	<i>Test d'activation du SST3</i> .....	- 106 -
B.	<i>Tests d'expression et de sécrétion de protéines du SST3</i> .....	- 106 -
C.	<i>Modèles d'infection in vitro</i> .....	- 107 -
D.	<i>Modèles d'infection in vivo</i> .....	- 108 -
E.	<i>Taux d'injection de la toxine ExoS-β-lactamase dans des cellules eucaryotes</i> .....	- 109 -
F.	<i>Etude de la polarisation de l'injection : quantification de la toxine chimérique ExoS bla sécrétée dans le milieu extracellulaire lors d'infections</i> .....	- 111 -
V.	<b>OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES</b> .....	- 111 -
A.	<i>Observation par microscopie électronique de PscN partiellement purifiée</i> .....	- 111 -
B.	<i>Comptage du nombre d'aiguilles</i> .....	- 111 -
C.	<i>Immunomarquage</i> .....	- 112 -
D.	<i>Observation des bactéries exprimant les protéines ExsB et PscC fusionnées aux étiquettes fluorescentes mCherry et sfGFP</i> .....	- 114 -
	<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	- 115 -
I.	<b>ETUDE DE L'ATPASE PSCN DU SST3 DE P. AERUGINOSA</b> .....	- 117 -
A.	<i>Implication de l'activité de l'ATPase PscN dans le SST3</i> .....	- 118 -
B.	<i>Purification de l'ATPase</i> .....	- 123 -
C.	<i>Conclusion et perspectives</i> .....	- 134 -
II.	<b>ETUDE DE LA PROTEINE EXSB</b> .....	- 138 -
A.	<i>Caractérisation de la protéine ExsB</i> .....	- 139 -
B.	<i>Effets de la délétion de exsB sur la virulence dans des modèles d'infection animaux</i> ....	- 144 -
C.	<i>Rôle de ExsB dans l'activité du SST3 in vitro</i> .....	- 147 -
D.	<i>Effet de la délétion du gène codant pour ExsB sur l'opéron de régulation du SST3</i> .....	- 148 -
E.	<i>Rôle de ExsB dans l'activité du SST3 in vitro en prenant en compte l'effet de la délétion de exsB sur l'opéron de régulation</i> .....	- 152 -
F.	<i>Effets de ExsB sur l'activité du SST3 dans des modèles d'infection de cultures cellulaires</i> .....	- 153 -
G.	<i>Rôle de ExsB dans l'assemblage du SST3</i> .....	- 160 -
H.	<i>Comportement de ExsB en l'absence de la sécrétine PscC</i> .....	- 175 -
I.	<i>Conclusions et perspectives</i> .....	- 176 -
	<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	- 185 -
	<b>ANNEXES</b> .....	- 191 -
	ANNEXE 1 : TABLEAU DES PROTEINES DETECTEES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DANS LES FRACTIONS D'ATPASE PSCN PARTIELLEMENT PURIFIEES .....	- 193 -
	ANNEXE 2 : ARTICLE SUR L'ACTIVITE DE FORMATION DES PORES DANS DES LIPOSOMES .....	- 196 -
	ANNEXE 3 : ARTICLE SUR LA CARACTERISATION STRUCTURALE ET LA LOCALISATION MEMBRANAIRE DE LA PROTEINE EXSB DU SST3 DE P. AERUGINOSA .....	- 210 -
	ANNEXE 4 : ARTICLE EN COURS DE REDACTION SUR L'ETUDE DU ROLE DE EXSB CHEZ P. AERUGINOSA .....	- 222 -
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	- 239 -

## Liste des figures

Figure 1 : Morphologie et mobilité de <i>P. aeruginosa</i> .....	19 -
Figure 2 : Principales étapes de l'attaque d'un hôte par <i>P. aeruginosa</i> .....	22 -
Figure 3 : Modes de vie de <i>P. aeruginosa</i> .....	23 -
Figure 4 : Microorganismes responsables d'infections nosocomiales en France en 2006...	24 -
Figure 5 : Prévalence des microorganismes responsables d'infections pulmonaires chez les patients souffrant de mucoviscidose aux Etats-Unis en 2001 .....	25 -
Figure 6 : Echelle de temps de l'apparition de résistances aux antibiotiques .....	26 -
Figure 7 : Facteurs de virulence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	27 -
Figure 8 : Systèmes de sécrétion présents chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	30 -
Figure 9 : Effets des toxines injectées par le SST3 dans les cellules cibles eucaryotes.....	34 -
Figure 10 : Similarités entre le bactériophage T4 et le SST6.....	38 -
Figure 11 : Réseau de régulation des facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> .....	39 -
Figure 12 : Régulation de la transcription de gènes cibles par le quorum sensing .....	40 -
Figure 13 : Régulation de l'expression de facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> par les senseurs RetS et LadS .....	41 -
Figure 14 : Stratégies d'inhibition des facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> .....	42 -
Figure 15 : Organisation des gènes codant pour le SST3 sur le chromosome de <i>P. aeruginosa</i> . .....	45 -
Figure 16 : Similarités structurelles entre le flagelle et le SST3 de <i>P. aeruginosa</i> .....	45 -
Figure 17 : Le SST3 .....	47 -
Figure 18 : Structures de chaperonnes cytoplasmiques du SST3.....	49 -
Figure 19 : Activation du SST3 chez <i>P. aeruginosa</i> en réponse à de faibles concentrations en calcium .....	55 -
Figure 20 : Principales étapes de l'assemblage du SST3 de <i>P. aeruginosa</i> .....	56 -
Figure 21 : Alignement des séquences des ATPases des SST3 de différentes bactéries. ....	60 -
Figure 22 : Caractéristiques des ATPases des SST3 .....	62 -
Figure 23 : Localisation génétique de <i>exsB</i> dans l'opéron de régulation du SST3 de <i>P. aeruginosa</i> , sous le contrôle du promoteur pC. ....	66 -
Figure 24 : Alignements de séquences d'acides aminés de ExsB.....	68 -
Figure 25 : Mode d'action de la machinerie Lol pour l'insertion des lipoprotéines dans la membrane externe. ....	69 -
Figure 26 : Caractéristiques des sécrétines.....	70 -
Figure 27 : Principe de la SOE PCR pour la délétion d'une séquence d'ADN. ....	88 -
Figure 28 : Principe de l'insertion ou la délétion de séquences d'ADN dans le chromosome de <i>P. aeruginosa</i> .....	92 -
Figure 29 : Principales étapes de fractionnement cellulaire pour la séparation du périplasme, du cytosol et des membranes de <i>P. aeruginosa</i> .....	97 -
Figure 30 : Composition des gradients de saccharose pour la séparation des membranes interne et externe. ....	98 -
Figure 31 : Principe de l'émission de fluorescence par le CCF2 dans le cytoplasme des cellules eucaryotes.....	110 -
Figure 32 : Mutations réalisées sur l'ATPase PscN .....	119 -
Figure 33 : Analyse par Western blot de l'expression de PscN et de la sécrétion de PopB dans les différentes souches de <i>P. aeruginosa</i> : $\Delta pscN$ , $\Delta pscN / his-pscN$ , $\Delta pscN / his-pscN_{K176A}$ , $\Delta pscN / his-pscN_{K176R}$ , $\Delta pscN / his-pscN_{R360D}$ .....	120 -
Figure 34 : Effet des mutations de l'ATPase PscN sur la cytotoxicité dépendante du SST3. ....	121 -

Figure 35 : Cytotoxicité dépendant du SST3 des souches sauvages de <i>P. aeruginosa</i> exprimant l'ATPase mutée.....	122 -
Figure 36 : Purification de His-PscN sur colonne de nickel à partir d'extraits de <i>P. aeruginosa</i> .....	125 -
Figure 37 : Cytotoxicité dépendant du SST3 des souches sauvages de <i>P. aeruginosa</i> exprimant l'ATPase fusionnée à différentes étiquettes protéiques. ....	127 -
Figure 38 : Mises au point de la purification sur colonne Streptactine de l'ATPase PscN portant une étiquette hexa-histidine en N terminal et Strep en C terminal, notée His-PscN-Strep. ....	128 -
Figure 39 : Chromatographie d'affinité sur colonne Streptactine pour la purification de l'ATPase PscN fusionnée à une étiquette Strep en N-terminal.....	130 -
Figure 40 : Chromatographie d'exclusion de taille réalisée sur la protéine Strep-PscN partiellement purifiée. ....	131 -
Figure 41 : Clichés de microcopie électronique des fractions partiellement purifiées de Strep-PscN. ....	132 -
Figure 42 : Schéma des rôles potentiels de l'ATPase PscN du SST3 de <i>P. aeruginosa</i> ....	135 -
Figure 43 : Caractérisation structurelle de ExsB.....	139 -
Figure 44 : Analyse par immunoblot de l'expression de ExsB dans des extraits bactériens des souches de <i>P. aeruginosa</i> CHA, PAO1 et PAO1F.....	140 -
Figure 45 : Compartimentation cellulaire pour l'étude de la localisation de ExsB. ....	141 -
Figure 46 : Etude de la localisation de ExsB au sein des membranes bactériennes.....	142 -
Figure 47 : Analyse par Western blot de l'expression de ExsB lors de la complémentation de la souche de <i>P. aeruginosa</i> dépourvue de <i>exsB</i> .....	143 -
Figure 48 : Souches de <i>P. aeruginosa</i> utilisées pour l'étude de la protéine ExsB. ....	144 -
Figure 49 : Courbes de survie des drosophiles infectées par les souches de <i>P. aeruginosa</i> sauvage (CHA), délétée de <i>exsA</i> ( $\Delta exsA$ ), et délétée de <i>exsB</i> ( $\Delta exsB$ ) .....	145 -
Figure 50 : Courbe de survie des souris infectées par les souches de <i>P. aeruginosa</i> sauvage (CHA), délétée de <i>exsB</i> ( $\Delta exsB$ ) et complétement ( $\Delta exsB/exsB$ ), et analyse statistique des résultats.....	146 -
Figure 51 : Expression (dans les extraits bactériens) et sécrétion (dans les surnageants) des translocateurs hydrophobe et hydrophile PopB et PcrV du SST3 des souches de <i>P. aeruginosa</i> sauvage (CHA), dépourvue de <i>exsB</i> ( $\Delta exsB$ ) et complétement ( $\Delta exsB/exsB$ ).....	147 -
Figure 52 : Analyse de l'activation du SST3 des souches de <i>P. aeruginosa</i> dans différentes conditions. ....	149 -
Figure 53 : Expression de ExsA dans les différentes souches de <i>P. aeruginosa</i> .....	151 -
Figure 54 : Expression (dans les extraits bactériens) et sécrétion (dans les surnageants) des translocateurs hydrophobe et hydrophile PopB et PcrV du SST3 des souches de <i>P. aeruginosa</i> sauvage (CHA), dépourvue de <i>exsB</i> ( $\Delta exsB$ ) et complétement ( $\Delta exsB/exsB$ ), surexprimant l'activateur du SST3, ExsA (+ <i>exsA</i> ) .....	152 -
Figure 55 : Cytotoxicité des différentes souches de <i>P. aeruginosa</i> sur des macrophages de souris .....	154 -
Figure 56 : Cytotoxicité des différentes souches de <i>P. aeruginosa</i> sur des cellules épithéliales de poumon.....	155 -
Figure 57 : Cytotoxicité des différentes souches de <i>P. aeruginosa</i> sur des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine.....	156 -
Figure 58 : Etude de l'injection de la toxine chimérique ExoS- $\beta$ -lactamase dans le cytoplasme de cellules eucaryotes après infection à une multiplicité d'infection (MOI) de 1 par différentes souches de <i>P. aeruginosa</i> .....	157 -

Figure 59 : Etude de la polarisation de l'injection des effecteurs du SST3 par les souches de <i>P. aeruginosa</i> produisant la toxine chimérique ExoS- $\beta$ -lactamase lors d'infection de cellules CHO. ....	159 -
Figure 60 : Analyse du nombre d'aiguilles du SST3 assemblées par les souches de <i>P. aeruginosa</i> délétées de <i>exsB</i> ( $\Delta exsB$ ) et complémentées ( $\Delta exsB/exsB$ ), dans des conditions d'induction du SST3.....	161 -
Figure 61 : Analyse de la stabilité des oligomères de sécrétine PscC dans les souches de <i>P. aeruginosa</i> sauvage (CHA), délétée de <i>exsB</i> ( $\Delta exsB$ ) et complémentée ( $\Delta exsB/exsB$ ). ....	163 -
Figure 62 : Séparation des membranes interne et externe par des détergents.....	164 -
Figure 63 : Séparation des membranes interne et externe par gradient de saccharose .....	166 -
Figure 64 : Clichés de microscopie à fluorescence verte (x100) des différentes souches de <i>P. aeruginosa</i> .....	169 -
Figure 65 : Overlay de lysats bactériens sur des membranes portant la protéine ExsB purifiée.-	170 -
Figure 66 : Overlay de la protéine ExsB purifiée sur des membranes portant des lysats bactériens de la souche de <i>P. aeruginosa</i> sauvage (CHA) ou délétée de <i>pscC</i> ( $\Delta pscC$ )....	171 -
Figure 67 : Immunoprécipitation de la protéine ExsB à partir d'extraits bactériens des souches de <i>P. aeruginosa</i> sauvage (CHA), délétée de <i>exsB</i> ( $\Delta exsB$ ) et complémentée ( $\Delta exsB/exsB$ ). ...	172 -
Figure 68 : Quantification des protéines ExsB et PscC exprimées dans <i>P. aeruginosa</i> sauvage. ....	174 -
Figure 69 : Etude de la localisation de ExsB en l'absence de la sécrétine PscC.....	176 -
Figure 70 : Structures de différentes pilotines : MxiM, du SST3 de <i>Shigella flexneri</i> ; ExsB, du SST3 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; PilW du pili de type IV de <i>Neisseria meningitidis</i> et OutS du SST2 de <i>Dickeya dadanti</i> .....	179 -
Figure 71 : Schéma du rôle probable de ExsB dans l'assemblage de la sécrétine. ....	180 -



## **Liste des tableaux**

Tableau 1 : Molécules sécrétées par le SST2 Xcp de <i>P. aeruginosa</i> et leur rôle.....	32 -
Tableau 2 : Caractéristiques communes et différences entre le système flagellaire et le SST3 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	46 -
Tableau 3 : Activité des pilotines de différents systèmes de sécrétion .....	71 -
Tableau 4 : Concentrations en antibiotiques utilisées pour la culture des bactéries .....	80 -
Tableau 5 : Conditions d'utilisation des différentes cellules eucaryotes pour l'étude de l'activité du SST3 dans ce travail.....	81 -
Tableau 6 : Oligonucléotides utilisés. ....	82 -
Tableau 7 : Plasmides utilisés .....	85 -
Tableau 8 : Cycles de PCR utilisés pour l'amplification d'une séquence d'ADN d'intérêt.....	87 -
Tableau 9 : Conditions de PCR utilisées pour la mutagenèse dirigée.....	87 -
Tableau 10 : Anticorps utilisés.....	94 -
Tableau 11 : Conditions d'utilisation des anticorps primaires pour l'immuno-marquage de protéines spécifiques chez les bactéries .....	113 -
Tableau 12 : Conditions d'utilisation des anticorps secondaires pour l'immunomarquage .....	113 -
Tableau 13 : Rôle des pilotines de SST3 bactériens sur leur sécrétine. ....	179 -

## Abréviations

AAA	<u>A</u> TPases <u>a</u> ssociated with diverse cellular <u>a</u> ctivities
ADN	<u>A</u> cide <u>d</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléique
ADP	<u>A</u> dénosine <u>d</u> iphosphate
ADPRT	<u>A</u> DP <u>r</u> ibosyl- <u>t</u> ransférase
AHL	N- <u>a</u> cyL L <u>h</u> omosérine <u>l</u> actones
AMPc	<u>A</u> dénosine <u>m</u> ono <u>p</u> hosphate <u>c</u> yclique
ARN	<u>A</u> cide <u>r</u> ibo <u>n</u> ucléique
ARNm	<u>A</u> cide <u>r</u> ibo <u>n</u> ucléique <u>m</u> essenger
ATP	<u>A</u> dénosine <u>t</u> ri <u>p</u> hosphate
Bla	<u>β</u> - <u>l</u> actamase
BSA	<u>A</u> lbumine de <u>s</u> érum <u>b</u> ovin
CAT	<u>C</u> hloramphenicol <u>a</u> cetyl <u>t</u> ransferase
CCCP	<u>C</u> arbonyl <u>c</u> yanide 3- <u>c</u> hloro <u>p</u> henylhydrazone
CFTR	<u>C</u> ystic <u>f</u> ibrosis <u>t</u> ransmembrane conductance <u>r</u> egulator
CHO	<u>C</u> ellules d' <u>o</u> vaire de <u>h</u> amster
DDM	n- <u>d</u> odecyl <u>β</u> - <u>D</u> - <u>m</u> altoside
D.O. <sub>600nm</sub>	<u>D</u> ensité <u>o</u> ptique à <u>600nm</u>
DTT	<u>d</u> ithio <u>t</u> hréitol
EDTA	<u>E</u> thylene <u>d</u> iamine <u>t</u> etra-acetic <u>a</u> cid
EGTA	<u>E</u> thylene <u>g</u> lycol <u>t</u> etra-acetic <u>a</u> cid
EHEC	<u>E</u> scherichia <u>c</u> oli <u>e</u> ntéro <u>h</u> émorragique
EPEC	<u>E</u> scherichia <u>c</u> oli <u>e</u> ntéro <u>p</u> athogénique
GAP	<u>P</u> rotéine <u>a</u> ctivant les <u>G</u> TPases
GFP	<u>G</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
GTP	<u>G</u> uanosine <u>t</u> ri <u>p</u> hosphate
HABA	2-[4' <u>h</u> ydroxy-benzene <u>a</u> zo] <u>b</u> enzoic <u>a</u> cid
Hepes	4-(2- <u>h</u> ydroxy <u>e</u> thyl) <u>p</u> iperazine-1- <u>e</u> thane <u>s</u> ulfonic acid
His	<u>h</u> istidine
HUVEC	<u>H</u> uman <u>u</u> mbilical <u>v</u> ein <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ell
IMAC	<u>I</u> mmobilized <u>m</u> etal <u>a</u> ffinity <u>c</u> hromatography
InVS	<u>I</u> nstitut de <u>v</u> eille <u>s</u> anitaire
LB	<u>L</u> uria <u>B</u> ertani
LC-MS/MS	<u>L</u> iquid <u>c</u> hromatography - tandem <u>m</u> ass <u>s</u> pectrometry
LDH	<u>L</u> actate <u>d</u> és <u>h</u> ydrogénase
LPS	<u>L</u> ipo <u>p</u> olysaccharide
MBP	<u>M</u> altose <u>b</u> inding <u>p</u> rotein
MOI	<u>M</u> ultiplicity <u>o</u> f <u>i</u> nfection
NADH	<u>N</u> icotinamide <u>a</u> denine <u>d</u> inucleotide <u>h</u> ydrogenated
PBS	<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PCR	<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
PFA	<u>P</u> ara <u>f</u> orma <u>l</u> déhyde
p.i.	<u>p</u> ost <u>i</u> nfection
PIA	<u>P</u> seudomonas <u>i</u> solation <u>a</u> gar
PVDF	<u>P</u> oly <u>v</u> inylidene <u>d</u> i <u>f</u> luoride
RBS	<u>R</u> ibosome <u>b</u> inding <u>s</u> ite
RPM	<u>R</u> otations <u>p</u> ar <u>m</u> inute
sfGFP	<u>S</u> uper <u>f</u> older <u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
SOE PCR	<u>S</u> lice <u>o</u> verlapping <u>e</u> xtension <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction

SDS PAGE	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate <u>p</u> oly <u>a</u> crylamide <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis
SST	<u>S</u> ystème de <u>s</u> écrétion de <u>t</u> ype
SST3	<u>S</u> ystème de <u>s</u> écrétion de <u>t</u> ype <u>III</u>
<i>spp.</i>	<u>s</u> pecies
T <sub>m</sub>	<u>T</u> emperature of <u>m</u> elting
TPR	<u>t</u> etratricopeptide <u>r</u> epeats
Tris	<u>T</u> ris(hydroxymethyl)aminomethane 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
VIH	<u>V</u> irus de l' <u>i</u> mmunodéficience <u>h</u> umaine

# Objectifs du travail



De nos jours, l'apparition de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, en particulier de pathogènes humains, est un véritable problème de santé publique. Ce phénomène est d'autant plus préoccupant qu'il s'amplifie rapidement, notamment dans les pays développés.

Outre les campagnes de sensibilisation pour une utilisation raisonnée des antibiotiques, différents moyens de lutte contre ce phénomène de multi-résistance sont envisagés. La compréhension des mécanismes de la pathogénicité, tant au niveau de la bactérie que de la réponse des cellules infectées, est indispensable au développement de nouvelles approches thérapeutiques. Ainsi, l'étude des facteurs de virulence bactériens peut permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et la mise au point de nouveaux médicaments.

Les bactéries pathogènes possèdent de nombreux facteurs de virulence qui leur permettent d'infecter et de coloniser leur hôte. Parmi ces facteurs de virulence, le système de sécrétion de type III (SST3) permet aux bactéries Gram négatives d'injecter des effecteurs (toxines) directement dans la cellule hôte afin de pirater des fonctions cellulaires cruciales.

Le SST3 est composé d'une vingtaine de protéines, assemblées en une sorte de seringue qui traverse les deux membranes bactériennes et la membrane de la cellule cible. Cette structure, semblable au flagelle bactérien, est conservée dans de nombreux pathogènes classés comme agents du bioterrorisme par le « Center for Disease Control and Prevention ». C'est le cas chez *Yersinia pestis*, l'agent responsable de la peste, *Burkholderia pseudomallei* causant la melioidose, *Chlamydia psittaci* à l'origine de la psittacose, *Vibrio cholerae* responsable du cholera, et les espèces de *Salmonella* et *Shigella* qui présentent des risques au niveau de la sécurité alimentaire, ...

D'autres pathogènes, qui possèdent un SST3 similaire, peuvent provoquer de graves infections chez l'Homme telles que des infections respiratoires, des diarrhées, ... Le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* est en France le troisième microorganisme responsable d'infections nosocomiales. Il est particulièrement dangereux pour les personnes immunodéprimées ou atteintes de mucoviscidose mais aussi dans les hôpitaux pour les patients en réanimation sous ventilation assistée. Par contre, il présente peu de risque pour les personnes en bonne santé. La présence d'un SST3 actif chez ce microorganisme est directement corrélée avec une plus forte mortalité des personnes infectées. C'est pourquoi l'étude de ce mécanisme de pathogénicité est très importante.

Les objectifs de mon projet de thèse étaient de caractériser le rôle de deux protéines du SST3 de *P. aeruginosa*, afin de mieux comprendre l'implication des différents composants dans le fonctionnement de cette machinerie.

- La première protéine à laquelle je me suis intéressée est l'**ATPase PscN**. Cette protéine est indispensable au fonctionnement du SST3, mais son action exacte est encore méconnue. Les protéines sécrétées par le SST3 sont associées à des chaperonnes dans le cytosol de la bactérie. Puis, elles seraient exportées seules à travers l'aiguille de sécrétion, dans un état déplié ou semi-déplié car le tunnel interne de l'aiguille est trop étroit pour permettre le passage des protéines repliées. L'ATPase pourrait donc apporter l'énergie nécessaire à la dissociation des protéines sécrétées de leurs chaperonnes, à leur dépliement avant leur sécrétion, et/ou à la sécrétion *per se*. La dissociation d'un complexe chaperonne-toxine ainsi que le dépliement d'une toxine ont pu être observés sous l'action de certaines ATPases de SST3 bactériens. Cependant, les chaperonnes et effecteurs sont spécifiques à chaque SST3, et aucune donnée n'est connue quant à l'action de l'ATPase sur des substrats du SST3 autres que les toxines. Un autre rôle hypothétique de l'ATPase est son implication dans la spécificité et la hiérarchie de sécrétion.

Le but était de caractériser l'activité de l'ATPase PscN de *P. aeruginosa* et de rechercher son rôle dans la sécrétion des substrats du SST3 autres que les toxines. Les effets de mutations de l'ATPase PscN sur l'activité du SST3 de *P. aeruginosa* ont été mesurés *in vivo*. Un protocole de purification de l'ATPase a également été mis au point afin de caractériser la protéine *in vitro* d'un point de vue enzymatique et biochimique pour tester son activité sur différents complexes substrats du SST3-chaperonnes.

- La seconde protéine étudiée durant la thèse est la **protéine ExsB**. Considérée comme non exprimée par plusieurs auteurs, elle présente pourtant une similarité de séquence d'acides aminés avec la protéine pilote (ou pilotine) YscW de *Yersinia spp.*. Cette pilotine a un rôle important dans la mise en place du SST3 puisqu'elle est impliquée dans la localisation et l'oligomérisation du composant de la membrane externe du système. Les pilotines sont une classe de petites protéines présentes également dans des systèmes de sécrétion autres que le SST3, tels que le système de sécrétion de type II ou le pili de type IV, et qui participent toujours à l'assemblage des sécrétines, qui

sont les composants de la membrane externe de ces machineries. Par contre, les structures des pilotines sont très peu conservées et les activités des pilotines vis-à-vis des sécrétines sont très diverses. De façon intéressante, le gène codant pour ExsB est localisé au sein de l'opéron de régulation du SST3, suggérant un rôle dans la régulation de ce système. Ainsi, ExsB de *P. aeruginosa* pourrait avoir un rôle de pilotine pour la sécrétine PscC, comme son homologue chez *Yersinia spp.* ou bien elle pourrait être impliquée dans la régulation du SST3.

L'objectif du travail était donc de caractériser cette protéine ExsB et déterminer son rôle dans le SST3 de *P. aeruginosa*. Pour cela, après avoir vérifié que la protéine ExsB est bien exprimée lorsque le SST3 est induit dans plusieurs souches de *P. aeruginosa*, la localisation de la protéine sauvage a été étudiée. Puis, afin de déterminer son rôle et son implication dans le SST3, un mutant délété du gène *exsB* a été construit et son phénotype étudié : virulence de la souche bactérienne, activation et activité du SST3, mais aussi localisation, stabilité et oligomérisation de la sécrétine PscC. Enfin, ses partenaires ont été recherchés par différentes techniques biochimiques.

Dans ce manuscrit, après une présentation des données bibliographiques permettant de préciser le contexte de l'étude et les hypothèses de travail, les matériels et méthodes, utilisés dans le but d'étudier les deux protéines ExsB et PscN, seront décrits. Les démarches expérimentales suivies et les résultats obtenus sur la caractérisation de ces deux protéines seront ensuite présentés. Nous verrons en conclusion que ces travaux ont contribué à améliorer la compréhension de l'assemblage et du fonctionnement du SST3 et ouvrent des perspectives intéressantes pour une approche thérapeutique nouvelle.





# **Chapitre I :** **Données** **bibliographiques**

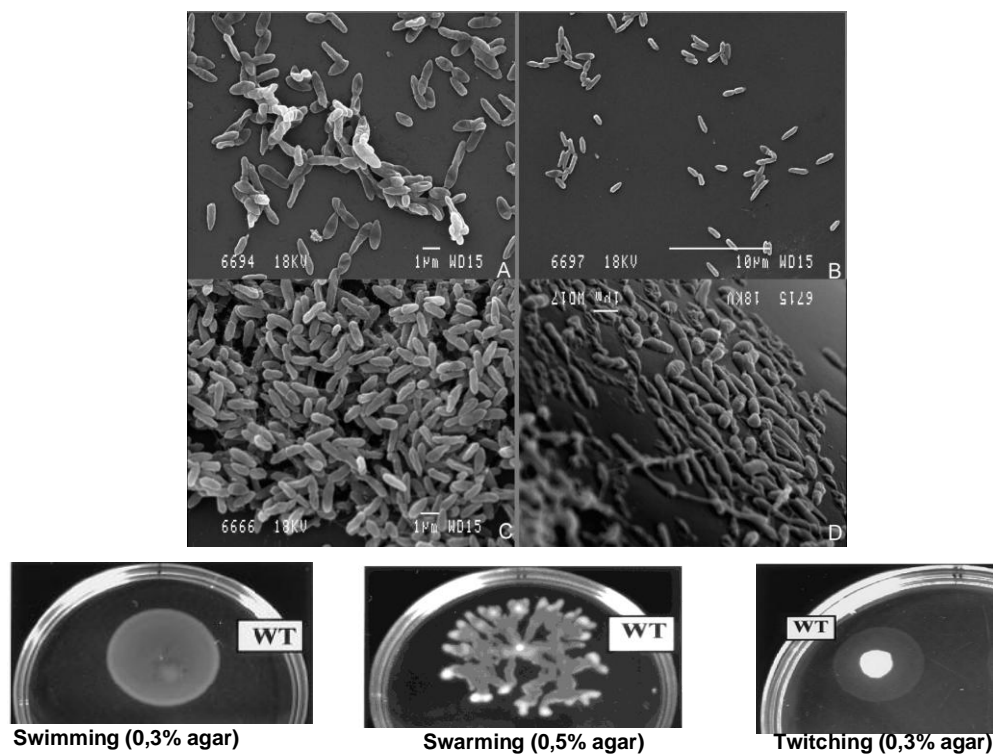


Dans ce chapitre, nous rappellerons l'état des connaissances sur *Pseudomonas aeruginosa* et plus particulièrement ses facteurs de virulence. Le ciblage de ces facteurs pourrait permettre d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-infectieuses. Dans cette perspective, il est indispensable de bien décrire et comprendre le Système de Sécrétion de Type III (SST3) de la bactérie. Nous ferons un point particulier sur les caractéristiques de l'ATPase du SST3 avant de présenter la protéine ExsB et son rôle potentiel dans le SST3 de *Pseudomonas aeruginosa*.

## I. *Pseudomonas aeruginosa*

### A. Description générale

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à Gram négatif découverte dans des infections humaines en 1862 par Luke. Elle a ensuite été isolée par Carle Gessard en 1882, qui lui a donné le nom de bacille pyocyanique du fait de sa morphologie (bâtonnets) et de sa capacité à produire des pigments de couleur bleue-verte (la pyocyanine et la pyoverdine) (Lyczak et al. 2000).



**Figure 1 : Morphologie et mobilité de *P. aeruginosa***

a) Cliché de microscopie électronique de *P. aeruginosa* d'après (Deligianni et al. 2010)  
 b) Photographie de boîtes de pétri montrant les différents types de mobilité de *P. aeruginosa* sauvage (noté WT), d'après (Rashid et al. 2000)

Comme illustré par ce cliché de microscopie (Figure 1), cette bactérie est un bacille d'environ 1 µm de long. Elle est mobile à la fois en milieu liquide, grâce à son unique flagelle polaire qui lui permet de nager (swimming), et en milieu solide, grâce aux pili qui lui permettent de se déplacer par glissement (twitching). Elle peut également se déplacer dans des milieux semi-solides par « swarming » grâce au flagelle.

*P. aeruginosa* possède un génome de 6,3 millions de paires de bases, bien plus important que les 4,6 millions de paires de bases de la bactérie *Escherichia coli*. Ses quelques 5570 séquences codantes lui confèrent une grande complexité génétique, proche d'organismes eucaryotes unicellulaires tels que la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui code pour 6200 protéines. Cela lui permet d'exprimer de nombreux systèmes protéiques pour capter, transporter et métaboliser des nutriments, permettant notamment le développement sur des substrats autres que le sucre. Peuvent aussi être cités des systèmes de chélation du fer, utilisant des sidérophores, des complexes macromoléculaires membranaires permettant l'export d'enzymes telles que des toxines, des lipases ou des protéases, des pompes à efflux conduisant à la résistance de la bactérie à certains antibiotiques. Enfin, 8% de son génome est consacré à la régulation fine de l'expression de ces systèmes, via des senseurs environnementaux et des protéines régulatrices. Finalement, cette grande complexité génétique, associée à une fréquence de mutations assez élevée permet à la bactérie de se développer et de s'adapter à des niches écologiques variées (Stover et al. 2000). Le taux de mutations est également connu pour augmenter lorsque la bactérie se développe dans des conditions de stress, par exemple en présence d'antibiotiques (Alonso et al. 1999 ; Martinez et al. 2000).

D'un point de vue métabolique, *P. aeruginosa* est donc très versatile. Sa température optimale de croissance est de 37°C mais elle peut se développer entre 25 et 42°C (Tsuji et al. 1982). La gamme de pH dans laquelle elle peut se développer est comprise entre 6 et 9 (Rahman et al. 2005). Elle peut métaboliser plus de 50 composés organiques mais également des composés inorganiques (Vasil 1986). En outre, cette bactérie est aérobie mais est capable de s'adapter à des conditions anaérobies. Lors de la respiration, elle utilise préférentiellement l'oxygène comme accepteur d'électrons, mais dans des environnements dépourvus d'oxygène elle utilise les nitrates (Vasil 1986).

Cette grande flexibilité métabolique permet à la bactérie de s'adapter et de se développer dans des conditions environnementales très diverses. Elle a en effet été détectée dans des

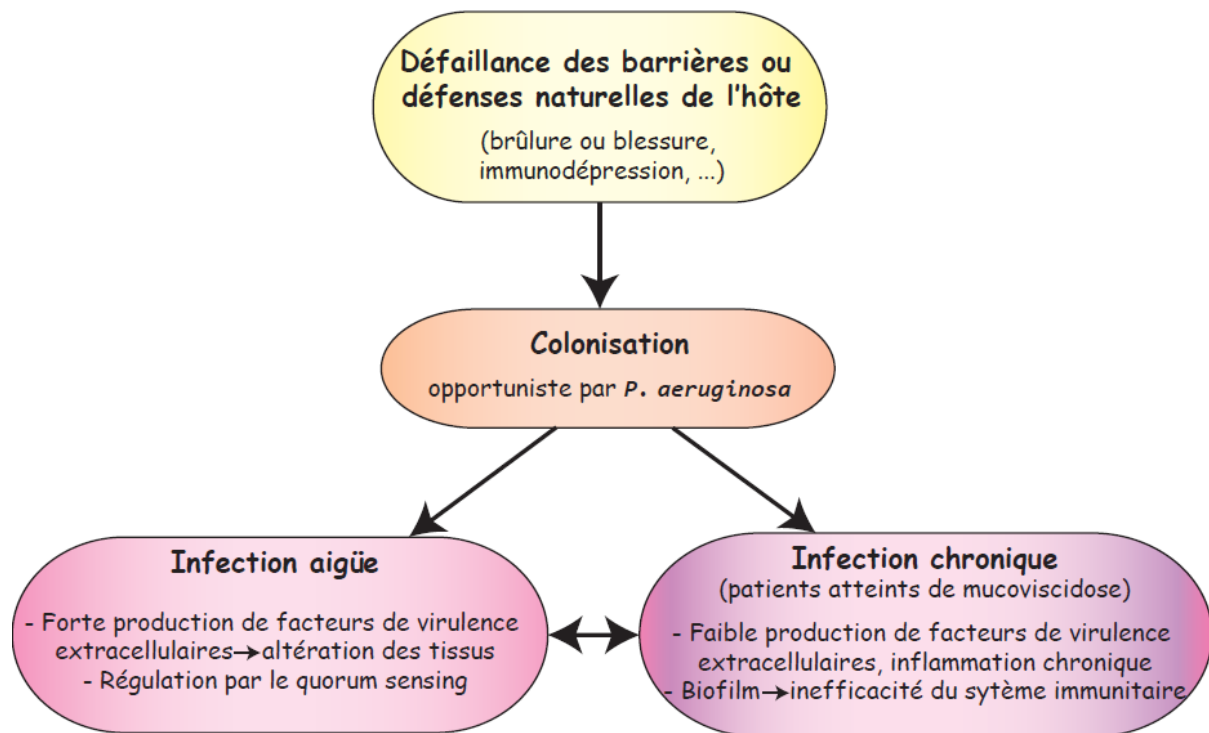
échantillons provenant de niches écologiques variées, telles que les sols et la rhizosphère, l'eau (eaux usées, océans, piscines), les canalisations, les plantes ... (Remold et al. 2011 ; Green et al. 1974 ; Berg et al. 2005 ; Cho et al. 2000 ; Regnath et al. 2004 ; Khan et al. 2008). Par exemple, la présence de la bactérie a été mise en évidence lors d'une étude menée en Californie dans 24% des sols des champs analysés. Les conditions les plus favorables à son développement dans l'environnement semblent être une humidité relative élevée (80-95%) et une température d'environ 27°C (Green et al. 1974). Il a également été montré que la bactérie est présente dans les environnements associés à l'homme, dans des prélèvements effectués dans des maisons : sur les surfaces, les déchets, l'eau, et même sur la peau et dans les selles de certains habitants/animaux de la maison. Cependant, la bactérie est principalement retrouvée dans les canalisations, et dans une moindre mesure dans les déchets et composts. Les canalisations auraient cinq fois plus de chances de porter ce bacille que les déchets/composts (Remold et al. 2011). Sa capacité à se développer dans des milieux si variés est d'ailleurs problématique puisque le bacille pyocyanique peut même se développer dans des solutions antiseptiques, des savons et sur des surfaces inorganiques (Lanini et al. 2011 ; Pollack 1995). En outre, *P. aeruginosa* est capable de coloniser et d'infecter un large spectre d'hôtes : les hommes tout d'abord, qui constituent son hôte usuel, mais aussi les souris, les insectes, les plantes, ... (D'Argenio et al. 2001 ; Saitou et al. 2009 ; Fotadar et al. 1989 ; Young 1977). Ce bacille est présent, en faible quantité, chez les personnes en bonne santé. Il est détecté sur la peau (0 à 2% des prélèvements), dans le nez (0 à 3,3% des prélèvements) ou la gorge (0 à 6,6% des prélèvements), mais également dans les selles (2,6 à 24% des prélèvements) puisqu'il vit de façon commensale dans le tube digestif de certaines personnes (Morrison et al. 1984 ; Cavallo 2004). Cependant, il s'agit d'un pathogène opportuniste, c'est-à-dire qu'il provoque une infection chez les hôtes fragilisés, immunodéprimés. Ainsi, le taux de *P. aeruginosa* détecté chez les personnes hospitalisées atteint 50% (Pollack 1995).

## **B. Infections**

### *1) Modes de vie et infections*

Pathogène opportuniste, *P. aeruginosa* profite de défaillance de l'hôte pour le coloniser et l'infecter (Figure 2). La défaillance peut être due à une rupture de l'intégrité des barrières physiques, notamment de la peau : blessure, brûlure, opération chirurgicale, intubation... mais aussi à des défenses immunitaires faibles, par exemple chez les personnes immunodéprimées lors de traitements de cancers, les patients atteints du VIH, ... Cette

première colonisation opportuniste peut conduire à des infections aiguës ou chroniques, qui sont liées à deux modes de vie bactériens distincts : planctonique ou sessile (en biofilm).



**Figure 2 : Principales étapes de l'attaque d'un hôte par *P. aeruginosa***  
(schéma adapté de (Strateva et al. 2011)).

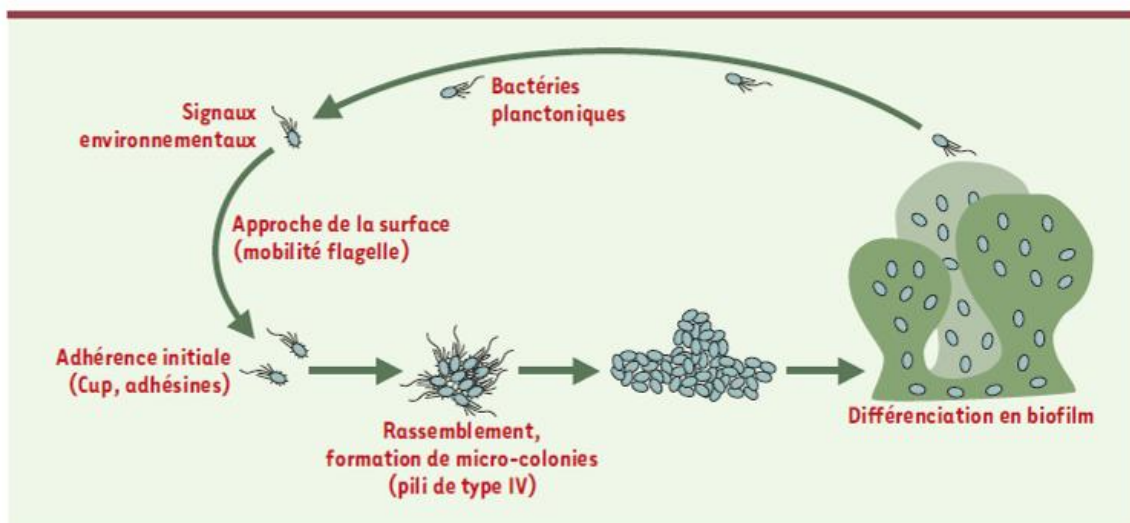
*La bactérie profite d'une faille dans les barrières de l'hôte pour le coloniser. Cette colonisation peut conduire à des infections aiguës ou chroniques. Chacun de ces deux types d'infection est associé avec un mode de vie de la bactérie, qui exprime alors différents facteurs de virulence.*

Sous sa forme planctonique, la bactérie est mobile et isolée et est capable de provoquer des **infections aiguës**. Les bactéries sont invasives et cytotoxiques, elles produisent de nombreux facteurs de virulence qui conduisent à un endommagement des tissus infectés. Les infections aiguës ont donc une progression rapide ; elles durent peu de temps et sont généralement brutales et agressives avec des symptômes sévères. Par exemple, *P. aeruginosa* peut causer des infections pulmonaires, urinaires, ou du système digestif, mais aussi des bactériémies chez les personnes gravement brûlées car ce pathogène opportuniste ubiquitaire profite de la perte de l'intégrité de la barrière de la peau pour infecter ces personnes. Elle provoque également fréquemment des kératites ulcératives aiguës chez les personnes portant des lentilles de contact, puisque les bactéries pénètrent dans les yeux via des microblessures et y sont maintenues par les lentilles (Lyczak et al. 2000).

Au contraire, le développement de *P. aeruginosa* sous forme sessile dans un biofilm est lié à des **infections chroniques**. Ce mode de vie permet aux bactéries de vivre en communauté, fixées à un support, ce qui leur confère une plus grande protection. Elles ne sont

pas invasives ni cytotoxiques et conduisent à des symptômes discrets. Cependant, les antibiotiques et les traitements habituels pour lutter contre l'infection sont inefficaces : les médicaments pénètrent mal la couche de bactéries et ciblent souvent leur croissance alors qu'elle est déjà plus faible dans les biofilms (Costerton 2001 ; Filloux 2003). De plus, même si ces infections chroniques sont peu agressives, elles sont persistantes car les bacilles colonisent durablement les patients et l'inflammation s'installe. Ce type d'infection est très fréquent au niveau des poumons des personnes souffrant de bronchiectasie, c'est-à-dire d'un endommagement des bronches, de maladie chronique obstructive pulmonaire, mais surtout chez les patients souffrant de la mucoviscidose (Lyczak et al. 2000 ; Valderrey et al. 2010).

Ces deux modes de vie, planctonique et en communauté, sont tous deux utilisés par *P. aeruginosa* lors de la colonisation d'un hôte (Figure 3). En effet, les bacilles se déplacent vers la surface à coloniser sous leur forme planctonique. Ils s'y fixent et s'y attachent puis des microcolonies apparaissent et mûrissent pour se développer en biofilm. Lorsque le biofilm atteint une taille conséquente, des cellules planctoniques se détachent et se dispersent pour coloniser de nouvelles surfaces (Filloux 2003).



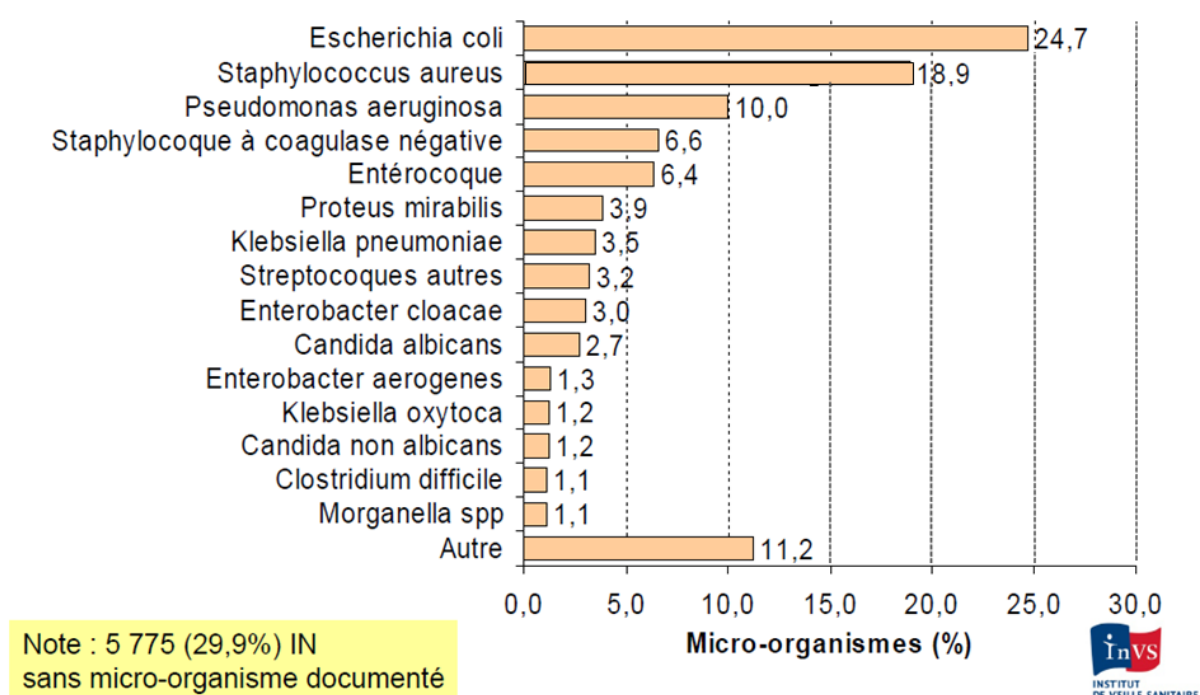
**Figure 3 : Modes de vie de *P. aeruginosa*, d'après (Filloux 2003)**

Ainsi, l'installation d'une infection chronique au niveau des poumons des personnes atteintes de mucoviscidose conduit à une élimination quasiment impossible de la bactérie et un phénomène d'inflammation. Des exacerbations, c'est-à-dire des épisodes d'infection aiguë, apparaissent et entraînent une détérioration définitive des tissus pulmonaires (Gibson et al. 2003 ; Hubert 2012).



## 2) Incidence en milieu hospitalier

*P. aeruginosa* est une bactérie pathogène opportuniste. Elle cause des infections aiguës et chroniques chez les personnes immunocompromises comme les blessés graves, les grands brûlés, ou les personnes atteintes de cancer. Ce pathogène pose aujourd'hui un véritable problème de santé publique. D'après une enquête coordonnée en 2006 par le Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (Raisin) dans les hôpitaux français, il est à l'origine de 10 % des infections nosocomiales et est la cause de 4000 décès par an (Figure 4). Il s'agit du troisième agent responsable d'infections nosocomiales derrière *Staphylococcus aureus* (18,9% des infections) et *Escherichia coli* (24,7% des infections).

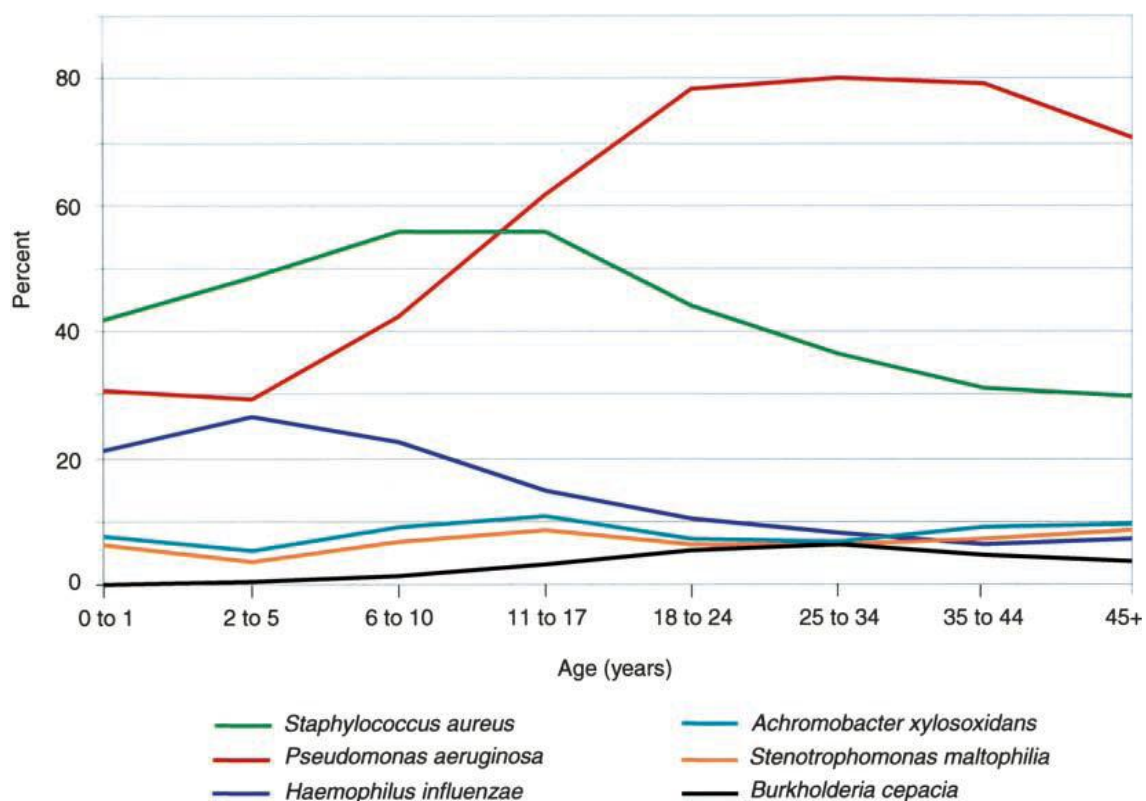


**Figure 4 : Microorganismes responsables d'infections nosocomiales en France en 2006 d'après (Thiolet 2007)**

De plus, *P. aeruginosa* est le micro-organisme le plus souvent impliqué dans des infections de patients en réanimation (14,8% des cas en 2011 d'après le réseau Raisin). Or la prévalence des personnes contractant des infections nosocomiales est dépendante des services fréquentés ; elle varie de 0,89% en obstétrique à 22,4% en réanimation.

L'ampleur de l'incidence des infections à *P. aeruginosa* en milieu hospitalier est également vraie dans la plupart des pays européens, et en Amérique du Nord (Lister et al. 2009 ; Lanini et al. 2011 ; Hakki et al. 2007).

Ce microorganisme opportuniste est particulièrement dangereux pour les patients atteints de mucoviscidose, puisqu'il représente leur première cause de mortalité et de morbidité (Govan et al. 1996). Cette maladie génétique très répandue (6500 personnes en France, 30000 aux Etats-Unis, 60000 dans le monde) est due à une mutation au niveau du gène codant pour la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). Cette protéine exprimée notamment dans les cellules épithéliales est impliquée dans le transport des ions chlorure et n'est plus fonctionnelle chez les personnes souffrant de la mucoviscidose, ce qui entraîne des troubles gastrointestinaux, endocriniens, métaboliques et pulmonaires. En effet, malgré un système immunitaire très actif, ces patients ne sont pas capables d'éliminer durablement les pathogènes responsables d'infections pulmonaires du fait d'anomalies dans la clairance mucovaciliaire dues à la mauvaise activité de CFTR et au mucus épais qui se forme. Les patients sont dès leur plus jeune âge infectés par divers microorganismes, principalement *Staphylococcus aureus*. Puis, au cours du temps, la bactérie *P. aeruginosa* devient la principale source d'infection pulmonaire, touchant jusqu'à 80% des personnes souffrant de mucoviscidose, comme illustré par le graphe suivant (Figure 5). L'infection par cette bactérie est corrélée à une détérioration de l'état de santé (Gibson et al. 2003 ; Costerton 2001).

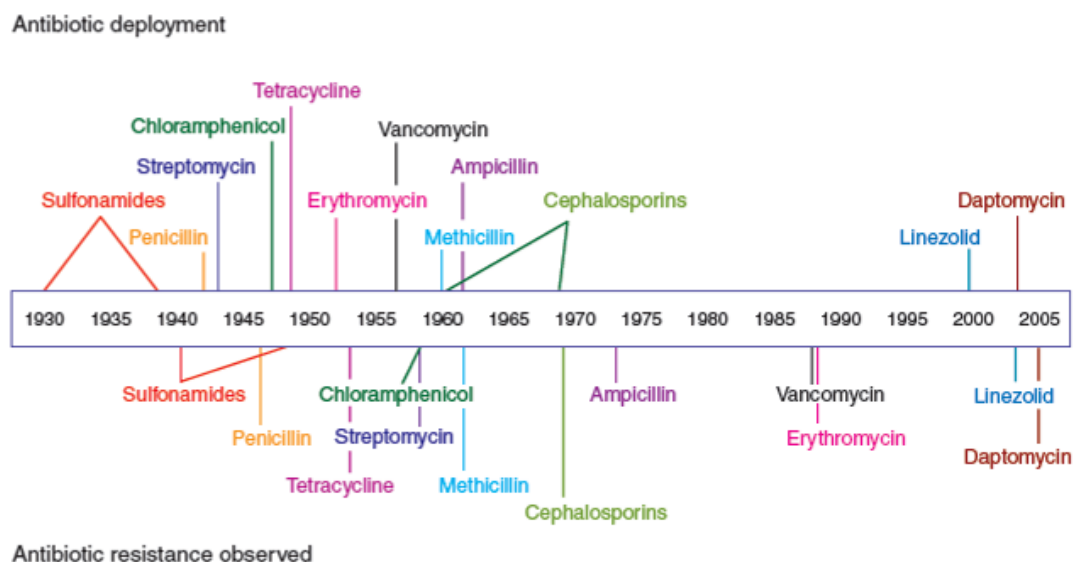


**Figure 5 : Prévalence des microorganismes responsables d'infections pulmonaires chez les patients souffrant de mucoviscidose aux Etats-Unis en 2001**  
d'après (Gibson et al. 2003))

De façon générale, *P. aeruginosa* est responsable de graves infections nosocomiales, conduisant dans 21% des cas décelés en France entre 2001 et 2006 au décès des patients (Nicolay 2008). Au sein des hôpitaux, la contamination des patients par cet agent pathogène peut provenir de différentes origines. Il peut y avoir transmission de la bactérie entre les patients, par le personnel hospitalier ou bien par le matériel médical (cathéters, sondes, canules, ...). Enfin, la source de la contamination peut être la présence d'un réservoir de bactéries dans les locaux de l'hôpital, comme dans les éviers et dans certains savons désinfectants (Lanini et al. 2011 ; Thiolet 2007).

### 3) Résistance aux antibiotiques et recherche de nouvelles thérapeutiques

Les antibiotiques traditionnels ont des effets soit bactericides (=capacité à tuer les bactéries) soit bactériostatiques (=capacité à limiter la croissance des bactéries). Or des souches résistantes à un antibiotique apparaissent toujours quelques années après le début de l'utilisation de cet antibiotique, comme illustré par la figure suivante (Figure 6).



**Figure 6 : Echelle de temps de l'apparition de résistances aux antibiotiques d'après (Clatworthy et al. 2007)**

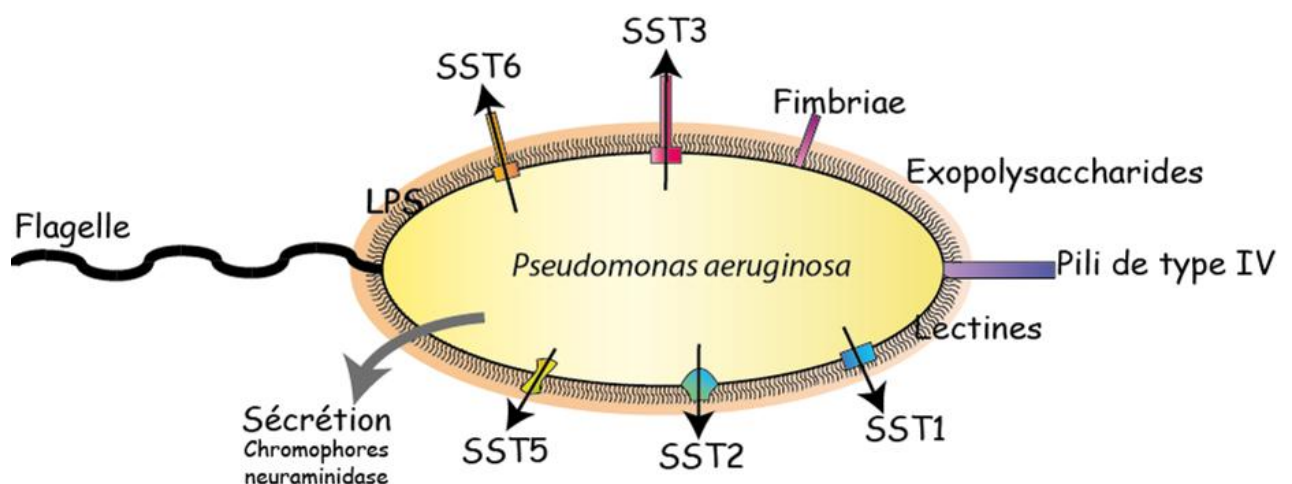
Le bacille *P. aeruginosa* est naturellement résistant à certains antibiotiques et a la capacité d'acquérir de multiples résistances (Strateva et al. 2009). Il possède en effet des pompes à efflux lui permettant de transporter des substances nutritives et d'exporter des substances toxiques dont les antibiotiques (Stover et al. 2000). De plus, l'importance de ce bacille dans des milieux pourtant très contrôlés comme les hôpitaux s'explique par une forte pression de sélection due à une utilisation massive de désinfectants et d'antibiotiques et à la

forte capacité d'adaptation de *P. aeruginosa* dans des environnements très variés. A titre d'exemple, une étude a montré qu'après 4 jours de culture du microorganisme en présence de tétracycline, le taux d'apparition de mutants résistants à cet antibiotique augmente de  $10^5$  fois (Alonso et al. 1999). Enfin, la bactérie est capable d'acquérir des gènes de résistance dans l'environnement par des éléments d'ADN mobiles (de Bentzmann et al. 2011).

La résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques rend son traitement difficile. Il est donc important d'étudier les facteurs de virulence de cette bactérie afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour développer de nouveaux médicaments. Le traitement devrait être spécifique et adapté à chaque type d'infection (phase aiguë et chronique, organe infecté), ce qui implique aussi le développement d'outils de diagnostic rapides. Ces nouvelles molécules thérapeutiques, ayant la capacité de bloquer les facteurs de virulence de la bactérie, présenteraient l'avantage de réduire la pression de sélection en comparaison aux antibiotiques classiques et de préserver la flore humaine (Clatworthy et al. 2007).

## II. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* possède de nombreux facteurs de virulence qui lui permettent de s'adapter et de résister à des conditions environnementales très différentes, et de coloniser et attaquer divers hôtes, tels que les mammifères, les poissons, les végétaux, .... Les facteurs de virulence peuvent être protéiques ou chimiques, sécrétés ou bien associés à la bactérie (Mikkelsen et al. 2009 ; Bricha 2009).



**Figure 7 : Facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa***  
Schéma adapté de (Van Delden et al. 1998)

## A. Les facteurs de virulence à la surface bactérienne : rôle dans l'adhésion et la mobilité

### 1) *Le flagelle*

*P. aeruginosa* possède un flagelle unique et polaire lui permettant de se déplacer en milieu liquide. Ce type de déplacement, la nage (« swimming ») lui permet d'atteindre la paroi épithéliale à coloniser. L'adhésion à cette surface est en partie médiée par une interaction des sous-unités constituant le flagelle FliC avec des glycolipides des cellules épithéliales (les asialo-GM1). Ainsi, les souches bactériennes dépourvues de flagelles présentent une virulence plus faible que les souches sauvages, avec une diminution de la mortalité et de la morbidité lors d'infections pulmonaires chez les souris. Cependant, le flagelle est aussi très immunogène, ce qui implique une forte réponse immunitaire de l'hôte. Lors d'infections chroniques, les bacilles perdent généralement leur flagelle afin d'échapper au système immunitaire. Le flagelle est néanmoins indispensable lors des premières étapes de l'infection pour envahir l'hôte (Bricha 2009 ; Feldman et al. 1998).

### 2) *Les pili*

En plus de nager en milieu liquide grâce au flagelle, les bactéries sont capables de se déplacer à des interfaces solides/liquides grâce aux **pili de type IV**. Cette sorte de déplacement, reposant sur la capacité de rétraction des pili, est appelée motilité par « twitching ». Cet appendice a donc un rôle dans l'invasion de l'hôte (Sato et al. 1988). Il est également le principal acteur de l'adhésion avec les cellules épithéliales, puisqu'il interagit avec des récepteurs de ces cellules (les glycolipides asialo-GM1 et GM2) (Sheth et al. 1994 ; Gupta et al. 1994). L'adhérence des bactéries médiée par le pilus est plus importante sur des cellules épithéliales pulmonaires possédant la mutation responsable de la mucoviscidose que sur des cellules épithéliales normales (de Bentzmann et al. 1996).

Les **pili de type fimbriae**, également appelés Cup (Chaperone Usher Pathway) ont un rôle dans l'adhésion des bactéries aux surfaces abiotiques et biotiques. Les bactéries possèdent souvent plusieurs copies du cluster de gènes codant pour ces Cup : les clusters *cupA*, *cupB* et *cupC* ont par exemple été identifiés dans la souche PA01, et un 4<sup>ème</sup> cluster *cupD* est présent dans l'isolat PA14. Chacune de ces copies serait activée pendant une seule étape de l'infection ou bien dans un environnement spécifique (chez un seul hôte ou dans un seul foyer infectieux) (Mikkelsen et al. 2009 ; Bricha 2009 ; Vallet et al. 2001).

### 3) *Les lipopolysaccharides*

Les lipopolysaccharides (LPS), présents à la surface de la membrane externe des bactéries, sont composés d'un lipide A hydrophobe, et d'une queue hydrophile formée par un corps de polysaccharides et l'antigène O.

Les lipides A peuvent avoir différentes acylations tandis que les antigènes O sont marqueurs de la spécificité des différents sérogroupes bactériens.

Les LPS sont essentiels à la virulence des bactéries (Goldberg et al. 1995). Ils sont également impliqués dans l'attachement des bactéries à des surfaces diverses selon leur taille et leur caractère plus ou moins hydrophobe (Filloux 2003 ; Makin et al. 1996). En particulier, l'adhérence aux cellules épithéliales eucaryotes est médiée par une interaction avec les récepteurs cellulaires Asialo GM1 (Gupta et al. 1994).

Enfin, ils ont un rôle dans la réponse immunitaire de l'hôte, et conduisent à l'apparition de symptômes tels que la fièvre, l'hypotension, .... Les lipides A sont reconnus par des composants du système immunitaire inné : les Toll-like receptors (le 4 notamment). De plus, une interaction avec la protéine CFTR des cellules eucaryotes, permettrait l'internalisation de *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales et une réponse rapide du système immunitaire. Chez les patients souffrant de mucoviscidose, cette protéine CFTR est mutée, ce qui conduirait à une moins bonne réponse immunitaire. De plus, chez ces personnes, *P. aeruginosa* peut échapper à la reconnaissance du système immunitaire en modifiant ses LPS. Par exemple, les acylations des LPS sont différentes et l'antigène O est absent (Gibson et al. 2003 ; Pier 2007).

### 4) *Exopolysaccharides*

*P. aeruginosa* produit trois types d'exopolysaccharides : les alginates, Psl et Pel. Tous sont importants pour la formation du biofilm lors d'infections chroniques. L'alginate, un polysaccharide linéaire composé d'acides mannuroniques et glucuroniques, a un rôle dans la structure des biofilms et dans l'attachement des bactéries aux cellules épithéliales (Kipnis et al. 2006 ; Doig et al. 1987). Sa présence conduit aussi à une diminution de l'efficacité des traitements antibiotiques et de la réponse immunitaire (Leid et al. 2005).

Le Psl est un polysaccharide riche en mannose et galactose essentiel à l'attachement des bactéries aux surfaces abiotiques et biotiques (Ma et al. 2007 ; Colvin et al. 2012 ; Ma et al. 2006) tandis que Pel, polymère riche en glucose similaire à la cellulose, est plus impliqué dans le développement tardif des biofilms (Ghafoor et al. 2011).

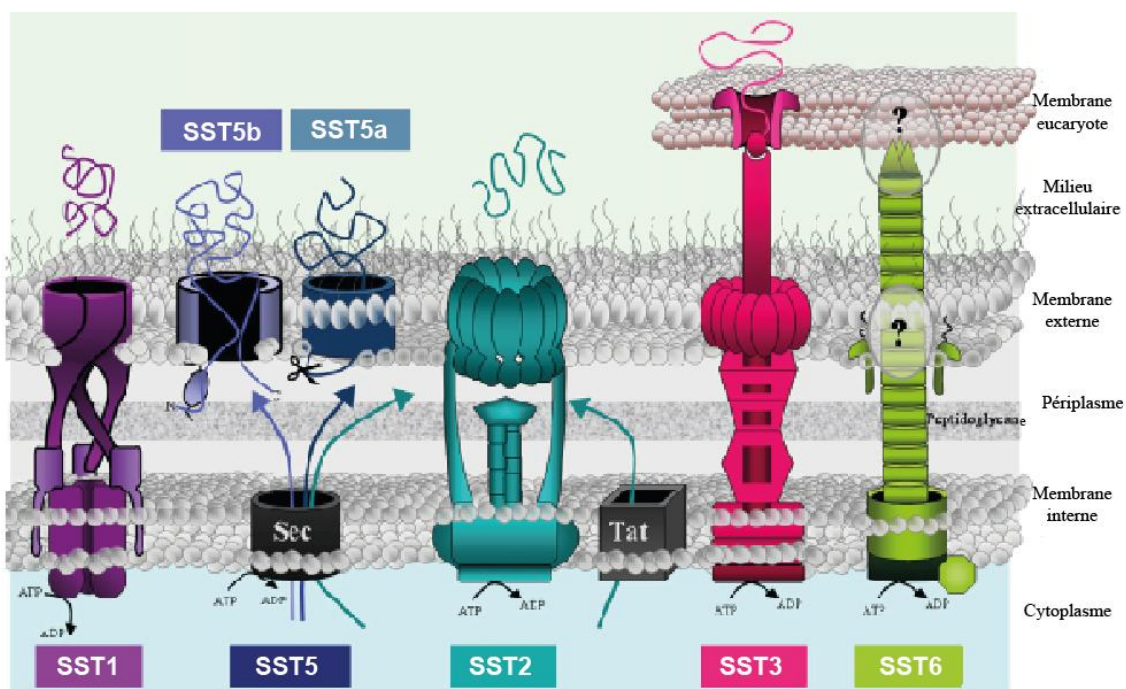


### 5) Les lectines

Les lectines LecA et LecB sont présentes dans le cytoplasme mais aussi au niveau de la membrane externe de *P. aeruginosa* (Tielker et al. 2005). Elles sont principalement impliquées dans les étapes précoces de l'infection, en participant à l'attachement des bactéries aux cellules hôtes. Elles se lient en effet spécifiquement au galactose et au fucose des cellules. Elles ont également un rôle dans la cytotoxicité puisque des mutants déficients en LecA ou LecB sont moins cytotoxiques *in vitro* sur des cellules épithéliales et conduisent à une atteinte du poumon, une charge bactérienne et une dissémination réduites *in vivo*. De plus, des inhibiteurs de lectines permettent d'atténuer la virulence des bactéries (Chemani et al. 2009).

### B. Les facteurs de virulence sécrétés dans le milieu extracellulaire ou dans les cellules cibles : rôle dans la cytotoxicité et l'invasion bactérienne

*P. aeruginosa* possède un large spectre de facteurs de virulence sécrétés par des systèmes d'export spécialisés, dont les systèmes de sécrétion de types I, II, III, V et VI, qui lui permettent de s'adapter, de survivre et d'exploiter l'environnement hostile de l'hôte. Ces machineries sont représentées sur la Figure 8. Elles conduisent au transport de molécules dans le milieu extracellulaire ou bien directement dans les organismes cibles (cellule eucaryote, bactérie).



**Figure 8 : Systèmes de sécrétion présents chez *Pseudomonas aeruginosa***  
D'après (Bleves et al. 2010)

### 1) *La neuraminidase*

La neuraminidase est une enzyme sécrétée par *P. aeruginosa* dans le milieu extracellulaire. Lors d'infections par ce microorganisme, son activité de clivage des acides sialiques (possédant une liaison  $\alpha$ 2-3) permet d'augmenter l'accessibilité des récepteurs asialo-GM1 des cellules eucaryotes. Par conséquent, un plus grand nombre de bactéries peut adhérer à ces cellules. L'important rôle de cette enzyme dans l'adhésion est confirmé par la réduction considérable de l'attachement des bactéries à des cellules épithéliales lorsque la neuraminidase est inhibée (Davies et al. 1999 ; Wolska et al. 2006). Des infections réalisées *in vivo* sur des souris ont également démontré l'implication de la neuraminidase dans la colonisation initiale des poumons (Soong et al. 2006).

### 2) *Les chromophores*

Plusieurs chromophores sont sécrétés : la pyocyanine, la pyoverdine et la pyocheline. La **pyocyanine** est un pigment bleu qui a des effets toxiques sur les cellules hôtes. Elle attire les neutrophiles et provoque leur apoptose mais est aussi impliquée dans le stress oxydatif, car elle est capable d'oxyder le glutathion et d'inactiver la catalase, empêchant les réactions de détoxification des espèces réactives de l'oxygène (Bricha 2009 ; Kipnis et al. 2006). Lors d'infections pulmonaires de souris, la virulence des bactéries est atténuée en l'absence de pyocyanine (Lau et al. 2004).

La **pyoverdine** et la **pyocheline** sont des sidérophores, leur fonction est de capter le fer et de le transporter. La pyoverdine pourrait également être impliquée dans la tolérance et l'homéostasie aux métaux (Schalk et al. 2012). De plus, la pyoverdine a un rôle dans la régulation de la sécrétion d'autres facteurs de virulence en plus de sa propre sécrétion : protéase IV, exotoxine A. L'activation de la transcription de ces facteurs de virulence dépend en effet de la concentration extracellulaire en pyoverdine (Kipnis et al. 2006 ; Bricha 2009).

### 3) *Les protéines sécrétées par le Système de Sécrétion de Type I*

Le SST1 est constitué d'une protéine de la membrane externe et d'un ABC transporteur dans la membrane interne, reliés par une protéine adaptatrice. Il permet de sécréter des protéines dans le milieu extracellulaire, en une seule étape.

Chez *P. aeruginosa*, il existe deux SST1 nommés Apr et Has. Le système Apr exporte AprA, une **protéase alcaline** (Bleves et al. 2010) dont l'activité est de dégrader les composants du complément, des cytokines et de chemokines (Laarman et al. 2012) ;



(Matheson et al. 2006) ; (Leidal et al. 2003). Elle permet ainsi à la bactérie de limiter la réponse immunitaire. Cette protéase est importante dans les infections de la cornée, et probablement aussi lors d'infections pulmonaires aiguës. Elle est également capable de lyser de la fibrine. Or, la formation de fibrine au début des infections pulmonaires semble importante pour limiter l'étendue de l'inflammation (Kipnis et al. 2006). Le second système, Has, permet la sécrétion de l'hémophore HasAp, servant à l'utilisation du fer de l'hémoglobine (Strateva et al. 2011 ; Bricha 2009).

#### 4) Les protéines sécrétées par le Système de Sécrétion de Type II

Le SST2 permet le passage à travers la membrane externe de protéines multimériques déjà repliées dans le périplasme. Ce système serait formé par une base de plusieurs protéines dans la membrane interne, prolongé par un large tube et un pseudopilus fonctionnant comme un piston. Chez *P. aeruginosa*, deux SST2 ont été identifiés : le système Xcp (pour Extracellular Protein) et le système Hxc (homologue à Xcp).

Le système Xcp sécrète plusieurs facteurs de virulence, comme indiqué dans le Tableau 1, notamment des protéases (Hoge 2010).

LasB	Elastase	Dégradation de l'élastine, du surfactant, ...	Braun et al.(1998)
Las A	Elastase	Dégradation de l'élastine et du surfactant	Braun et al.(1998)
PlcH	Phospholipase C hémolytique	Dégradation des phospholipides du surfactant et des membranes eucaryotes	Voulhoux et al.(2001)
PlcN	Phospholipase C non hémolytique	Dégradation des phospholipides du surfactant et des membranes eucaryotes	Voulhoux et al.(2001)
PlcB	Phospholipase C spécifique des phosphatidyl-ethanolamine	Dégradation des phosphatidyl-ethanolamine du surfactant et des membranes eucaryotes	Barker et al.(2004)
CbpD	Protéine liant la chitine	Probable adhésine	Folders et al.(2000)
ToxA	ABToxin,ADP-ribosyltransferase	ADP ribosyltransférase du facteur d'élongation 2 des cellules eucaryotes	Lu et al.(1993)
PmpA	Métalloprotéase putative	Probable dégradation de protéines	Bleves et al (2010)
PrpL	Protéase IV	Dégradation de protéines du surfactant, immunoglobuline, et autres protéines de la défense de l'hôte	Fox et al.(2008)
LipA	Lipase	Dégradation de lipides, dont ceux du surfactant	Jaeger et al.(1994) ; Son et al (2007)
LipC	Lipase	Dégradation de lipides, dont ceux du surfactant	Martinez et al.(1999)
PhoA	Phosphatase alcaline		Filloux et al.(1988)
PaAP	Aminopeptidase	Dégradation des peptides et protéines	Braun et al.(1998)

**Tableau 1 : Molécules sécrétées par le SST2 Xcp de *P. aeruginosa* et leur rôle d'après (Bleves et al. 2010)**

Il sécrète en particulier :

- des enzymes protéolytiques dont les **élastases** LasA et LasB, qui dégradent l'élastine, un composant majeur des vaisseaux sanguins et des tissus du poumon humain. Elles dégradent aussi le surfactant pulmonaire. Le surfactant, dont le rôle tensio-actif est

indispensable au bon fonctionnement du système respiratoire, est constitué à 90% de lipides et à 10% de protéines, dont SP-A et SP-D (Surfactant Protein A et Surfactant Protein D). Ces dernières ont une action fungi- et bactério-statiques et, via une interaction avec les chaînes glucidiques à la surface des micro-organismes, permettent l'agglutination des pathogènes ainsi que le recrutement de cellules du système immunitaire (Tzortzaki 2007). Les élastases clivent ces protéines surfactantes SP-A et SP-D. L'élastase LasA, une sérine protéase, a une faible activité élastolytique mais augmente l'activité de LasB en rendant l'élastine plus accessible au clivage (Kessler et al. 1997). LasB, protéase contenant du zinc, est également capable de dégrader d'autres substrats, tels que la fibrine et la fibronectine, le collagène, et d'inactiver des molécules importantes pour l'élimination du pathogène par l'hôte, notamment les immunoglobulines G et A et des composants du complément (Strateva et al. 2011). Ces enzymes sont importantes pour l'invasion des cellules épithéliales (Cowell et al. 2003).

- des **lipases** et des **phospholipases** dont la phospholipase C. Cette dernière est une enzyme thermolabile dont le rôle est de dégrader les phospholipides présents notamment dans le surfactant pulmonaire et les membranes des cellules eucaryotes. Elle participe ainsi aux dommages tissulaires et facilite l'invasion bactérienne (Strateva et al. 2011 ; Bricha 2009).

- l'**exotoxine A**, qui cible un facteur eucaryote intracellulaire. Elle est composée de 3 domaines : l'un pour l'interaction avec des récepteurs de cellules eucaryotes, un autre pour le transport de la toxine à travers les compartiments intracellulaires et un dernier pour l'activité catalytique (Voulhoux et al. 2000). Son activité dans la cellule cible est l'ADP ribosylation du facteur d'élongation 2, conduisant au blocage de la synthèse des protéines et à la mort cellulaire.

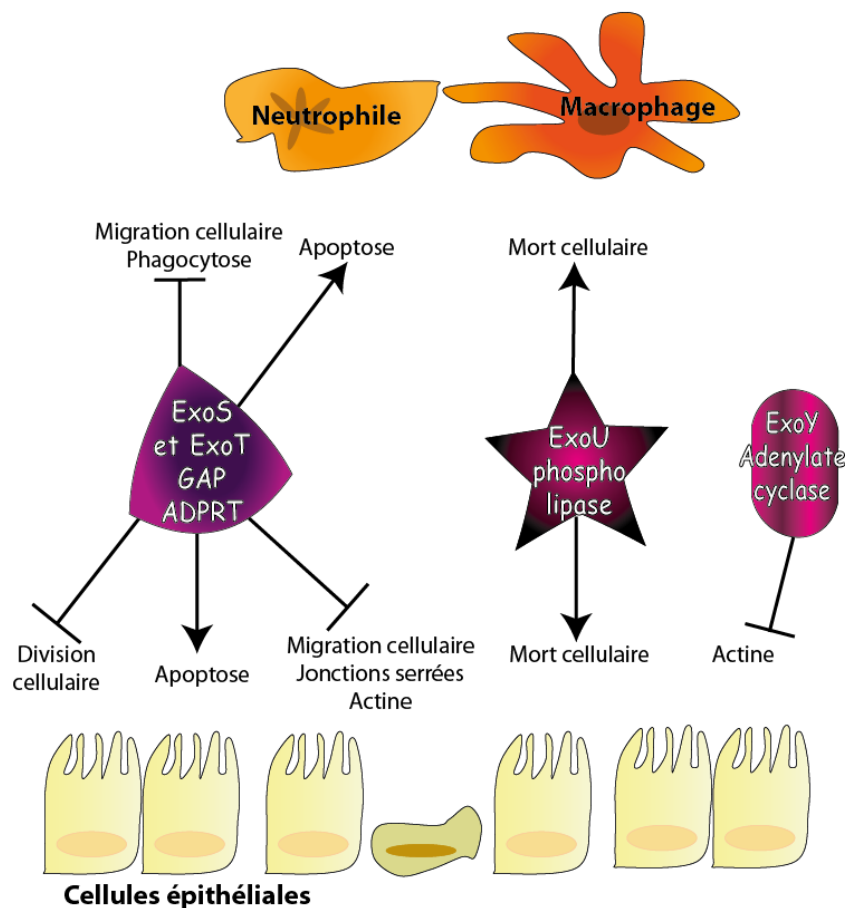
- la **protéase IV**, une sérine protéase. Du fait de son activité de clivage des peptides contenant de la lysine, elle est capable de digérer des protéines de défense de l'hôte, telles que l'immunoglobuline, les composants du complément, le fibrinogène, ... (Engel et al. 1998). Cette enzyme dégrade également des protéines du surfactant (Malloy et al. 2005). Les souches bactériennes qui ne possèdent pas cette protéase montrent une virulence atténuée dans des modèles de kératite oculaire chez le lapin et la souris. De plus, la protéase semble faciliter l'adhésion à la cornée (Engel et al. 1997).

Le système Hxc, quant à lui, est actif seulement en conditions de limitation en phosphate et sécrète la **phosphatase alcaline** LapA (Bleves et al. 2010 ; Ball et al. 2002).

### 5) Les effecteurs sécrétés par le Système de Sécrétion de Type III

Le SST3 permet l'injection d'enzymes directement dans le cytoplasme de la cellule eucaryote cible. Constitué de plus d'une vingtaine de protéines, le mode d'action de ce complexe est similaire à celui d'une seringue. Sa composition et son fonctionnement seront détaillés dans la partie suivante.

Ce système exporte plusieurs exoenzymes appelées ExoS, ExoT, ExoY et ExoU et toutes dotées d'activités perturbant la signalisation de la cellule eucaryote (Figure 9). L'analyse de la distribution de ces toxines dans des isolats provenant de patients hospitalisés ou bien de l'environnement a montré que 100% des isolats ont la séquence codant pour ExoT, 72% pour ExoS, 28% pour ExoU et 89% pour ExoY. De plus, 98% des isolats possèdent ExoS ou ExoU mais pas les deux (Feltman et al. 2001 ; Berthelot et al. 2003).



**Figure 9 : Effets des toxines injectées par le SST3 dans les cellules cibles eucaryotes**  
D'après (Engel et al. 2009)

**ExoS** possède deux activités enzymatiques : une activité GAP (GTPase Activating Protein), et une activité ADPRT (ADP Ribosyl-Transférase).

L'activité GAP, localisée au niveau de son domaine N terminal, a un effet sur les facteurs eucaryotes Rho, Rac et Cdc42, provoquant une désorganisation du cytosquelette d'actine avec arrondissement cellulaire (Sun et al. 2004). Elle est également impliquée dans l'inhibition de l'internalisation et de la phagocytose des bactéries (Deng et al. 2008).

Le domaine C terminal de ExoS est quant à lui responsable de son activité ADP ribosyltransférase envers Ras, Ral et d'autres GTPases Rabs ainsi que les protéines ERM (ezrine, radixine et moesine), qui permettent de lier l'actine à la membrane plasmique (Maresso et al. 2004). Cette activité dépend de la présence de la protéine eucaryote 14-3-3. Elle est indispensable à la virulence complète de *P. aeruginosa* et est très impliquée dans la persistance bactérienne en permettant d'échapper au système immunitaire et enfin dans la dissémination (Shaver et al. 2004).

ExoS perturbe ainsi la synthèse d'ADN chez la cellule hôte, et sa cytotoxicité conduit à la mort cellulaire. En outre, l'activité ADPRT de ExoS a un rôle particulièrement important dans l'augmentation de la perméabilité épithéliale et la perturbation des fibres de stress de l'actine (Soong et al. 2008). En conséquence, l'intégrité des jonctions épithéliales respiratoires est altérée et la dissémination des bactéries est facilitée. L'activité ADPRT permet également le recrutement de cellules immunitaires, notamment des neutrophiles, tout en induisant la survie des bactéries intracellulaires et l'apoptose de ces neutrophiles (Sun et al. 2012). En effet, cette activité ADPRT empêche la maturation des vésicules en endosomes (Deng et al. 2008) et provoque la formation de « blebs », c'est-à-dire des protrusions de la membrane plasmique eucaryote dissociée du cytosquelette d'actine, avant l'apoptose de la cellule hôte. Les « blebs » peuvent se séparer de la cellule et se déplacer dans l'organisme infecté, et les bactéries enfermées à l'intérieur de ces structures restent protégées contre le système immunitaire et certains antibiotiques tels que la gentamicine. Finalement, l'activité ADPRT de l'effecteur ExoS a pour conséquence l'inhibition de l'endocytose et la survie et la dissémination des bactéries intracellulaires (Angus et al. 2010).

**ExoT** possède 74% de similarité de séquence d'acides aminés avec ExoS. Cette enzyme est également bifonctionnelle, avec une activité GAP à son extrémité N terminale et une activité ADP ribosyltransférase localisée au niveau du domaine C terminal. Son activité GAP est similaire à celle d'ExoS, perturbant le cytosquelette d'actine et empêchant l'internalisation des bactéries, mais son activité ADPRT est 500 fois plus faible. De plus, les domaines ADPRT de ExoS et ExoT ne ciblent pas les mêmes facteurs eucaryotes : ExoT a une activité envers les protéines CrkI et CrkII, des phosphoglycérate kinases (Sun et al. 2003).

Les effets relevés sont assez faibles et parfois contradictoires, en fonction du lieu de l'infection et de la quantité de bactéries utilisée pour l'infection. Ainsi, une étude a démontré un effet protecteur de cette toxine *in vitro* et *in vivo* dans des modèles d'infection pulmonaire de souris (Lee et al. 2005). A l'inverse, d'autres études ont montré un rôle dans la dissémination des bactéries du poumon vers d'autres organes, tels que le foie (Shaver et al. 2004) ou bien dans la virulence envers des neutrophiles dans des modèles de kératite (Sun et al. 2012) et l'induction de l'apoptose de cellules épithéliales (Shafikhani et al. 2008). De façon intéressante, l'induction de la mort cellulaire par ExoT apparaît après 5 à 10h d'infection, bien plus tardivement que celle provoquée par la toxine ExoS (2 à 5h après infection). Finalement, ExoT est importante pour la virulence bactérienne même si ses effets sur les cellules hôtes sont moindres que ceux causés par ExoS.

**ExoY** présente une activité adénylate cyclase conduisant à une concentration élevée en AMP cyclique (AMPC) dans la cellule hôte (Strateva et al. 2011). L'AMPC est un intermédiaire indispensable de la signalisation eukaryote puisqu'elle est impliquée dans les cascades de phosphorylation (Waterman et al. 1985). Cette activité provoque l'arrondissement des cellules infectées et inhibe l'invasion bactérienne. Néanmoins, cette inhibition est observée seulement à de faibles temps après infection, de 2h environ (Cowell et al. 2005). De plus, ExoY a un rôle dans la formation des « blebs », comme ExoS, puisqu'elle est capable d'activer la formation de ces protrusions membranaires, sans toutefois conférer davantage de croissance intracellulaire aux bactéries. Dans des modèles d'infection aiguë (kératite) *in vivo*, l'activité de ExoY contribue à une augmentation de la colonisation bactérienne ainsi qu'à une maladie plus forte (Hritonenko et al. 2011).

**ExoU** est la plus toxique des enzymes injectées par le SST3. Lors de pneumonies aiguës provoquées par *P. aeruginosa* sur des modèles murins, l'expression de cette toxine par des souches non cytotoxiques est à l'origine d'une augmentation de la charge bactérienne dans le poumon, d'une dissémination plus importante dans le foie et la rate et d'une réduction de 50% de la dose létale de bacilles (Allewelt et al. 2000). La toxine ExoU a été récemment caractérisée d'un point de vue structurel et fonctionnel (Gendrin et al. 2012). Son domaine N-terminal est maintenu dans une conformation non globulaire par sa chaperonne cytoplasmique SpcU. Après sa translocation dans la cellule eucaryote cible, ExoU est rapidement associée à la membrane eucaryote par une liaison de son domaine C-terminal aux phospholipides. Cette toxine subit ensuite un changement de conformation lui permettant d'insérer partiellement son

site catalytique, responsable de l'activité phospholipase, dans la membrane cible. Ce domaine phospholipase est activé suite à une interaction avec un facteur de la cellule hôte et provoque la lyse rapide des phospholipides membranaires, conduisant à la lyse de la cellule infectée. La cellule tenterait de se protéger en dégradant ExoU par ubiquitination puis ciblage vers les endosomes, mais l'activité phospholipase est bien plus rapide (Gendrin et al. 2012).

L'injection d'ExoU par le SST3 a ainsi pour conséquence la mort cellulaire de cellules épithéliales, CHO, macrophages, neutrophiles... (Strateva et al. 2011). Or, dès le début d'une infection, des cellules phagocytiques du système immunitaire, principalement des neutrophiles, sont recrutés. La lyse de ces cellules par ExoU provoque une augmentation du nombre de neutrophiles présents sur le lieu de l'infection mais aussi une diminution de leur viabilité. Il en résulte une immunosuppression localisée, expliquant la persistance de la bactérie et la surinfection par d'autres bactéries (telles que des souches de *P. aeruginosa* ne sécrétant pas ExoU ou des bactéries normalement non pathogènes comme *E. coli*). Les pneumonies acquises dans les hôpitaux sont d'ailleurs souvent poly-microbiennes (Diaz et al. 2008).

#### 6) Les toxines sécrétées par le Système de Sécrétion de Type V

Il existe plusieurs types de SST5 chez *P. aeruginosa*, permettant la sécrétion de facteurs de virulence dans le milieu extracellulaire.

Le SST5b, système de sécrétion très répandu chez les bactéries Gram négatif, permet l'export de protéines en deux étapes. Dans un premier temps, le transport à travers la membrane interne est effectué par le système Sec. Puis, un tuyau en  $\beta$  barril permet le transport à travers la membrane externe. Ce système participe ainsi à la sécrétion d'adhésine et a un rôle dans la mise en place des pili de type fimbriae (Bleves et al. 2010). Il sécrète aussi la protéase LepA, responsable de l'activation du facteur de transcription cellulaire NF-kappaB et donc des réponses immunitaires de l'hôte (Strateva et al. 2011).

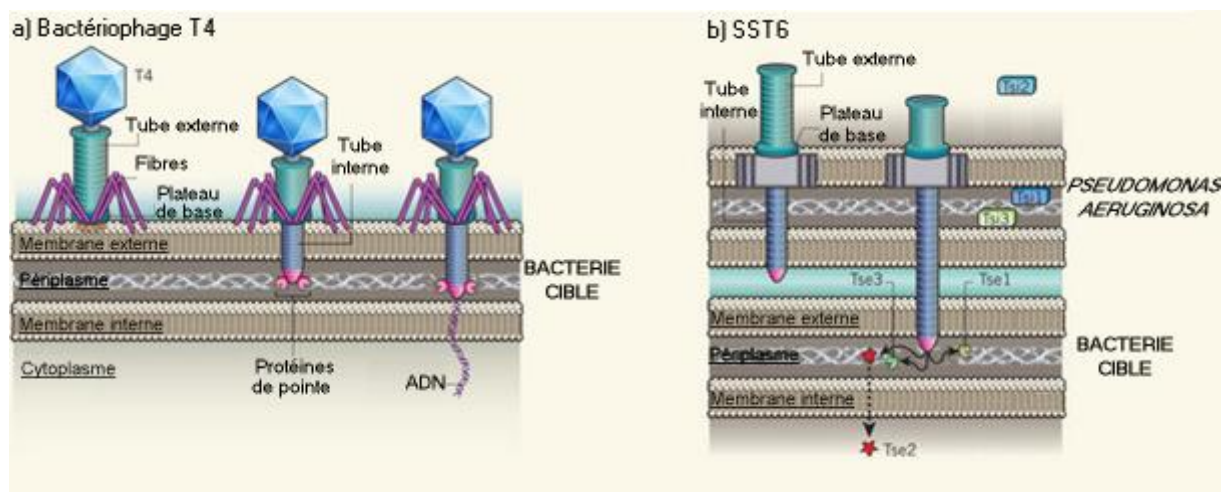
L'autre type de SST5 rencontré chez le bacille pyocyanique est un autotransporteur : EstA. Du fait de son activité estérase, il est impliqué dans la production des **rhamnolipides**. Ces glycolipides extracellulaires, dont le rôle de biosurfactant permet la solubilisation des phospholipides du surfactant pulmonaire, facilite l'accès des phospholipides à la phospholipase C. Ils présentent également une activité hémolytique et anti-bactérienne (sur les micro-organismes Gram positifs principalement), perturbent la réponse immunitaire de l'hôte (inhibition de la phagocytose, ...), altèrent la barrière épithéliale pulmonaire

(participant ainsi à l'invasion bactérienne) et enfin sont impliqués dans la formation du biofilm (Soberon-Chavez et al. 2005 ; McClure et al. 1992 ; Zulianello et al. 2006).

#### 7) Les protéines sécrétées par le Système de Sécrétion de Type VI

Le SST6, fréquemment rencontré chez les bactéries à Gram négatif, partage de nombreuses homologues avec la queue du bactériophage T4. Sa structure et son mode d'action présenterait donc des similarités avec ce phage, comme illustré par la Figure 10 (Cotter 2011).

La contraction de la « queue » permettrait l'injection de toxines dans des bactéries ou cellules cibles (Filloux et al. 2008). Chez *P. aeruginosa*, 3 loci codant pour le SST6 ont été identifiés, et sont régulés de manière différente. Le système codé par le premier locus permet la translocation de trois substrats, appelés Tse1, 2 et 3, et ciblerait spécifiquement les bactéries (Cotter 2011).



**Figure 10 : Similarités entre le bactériophage T4 et le SST6**

**a) Injection d'ADN dans la bactérie cible par le bactériophage T4 b) Injection de toxines par le SST6 de *P. aeruginosa* dans la bactérie cible (Cotter 2011)**

L'injection de la toxine Tse2 dans le cytoplasme des bactéries voisines a pour effet l'inhibition de leur croissance. Cette toxine n'a pas d'effet sur *P. aeruginosa* car cette dernière possède aussi une "anti-toxine", appelée Tsi2, pour se protéger.

De même, les toxines Tse1 et Tse3 sont injectées dans le périplasme de la bactérie cible où elles dégradent le peptidoglycane. Par contre, elles n'ont pas d'effet sur *P. aeruginosa* qui possède des « anti-toxines » Tsi1 et Tsi3 (Russell et al. 2011). Ce SST6 donne ainsi un avantage de croissance certain au bacille pyocyanique par rapport aux autres procaryotes (Bleves et al. 2010 ; Hood et al. 2010).



### C. Régulation des systèmes de virulence

L'expression des multiples facteurs de virulence est finement contrôlée à différents niveaux : transcriptionnels, post-transcriptionnels et post-traductionnels. Ces mécanismes de régulation sont nombreux, comme le laisse prévoir la part importante (8%) du génôme de *P. aeruginosa* codant pour des protéines régulatrices (Winsor et al. 2011). De plus, les régulateurs transcriptionnels sont interconnectés (Galan-Vasquez et al. 2011), comme illustré par la Figure 11.

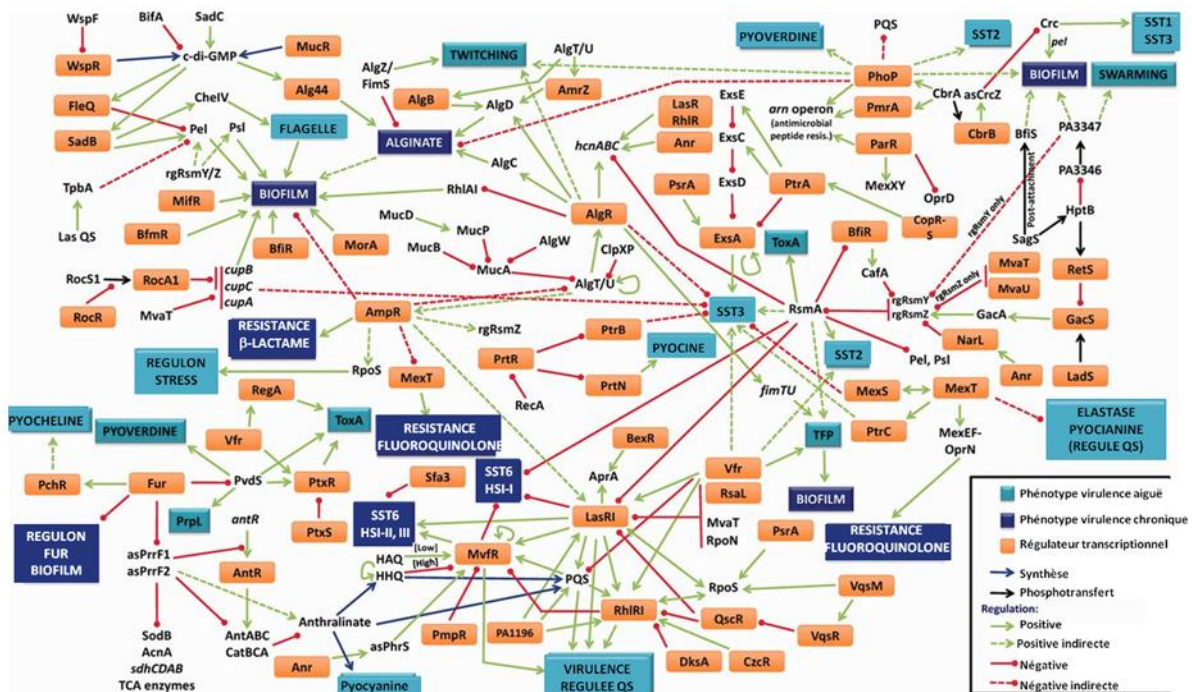
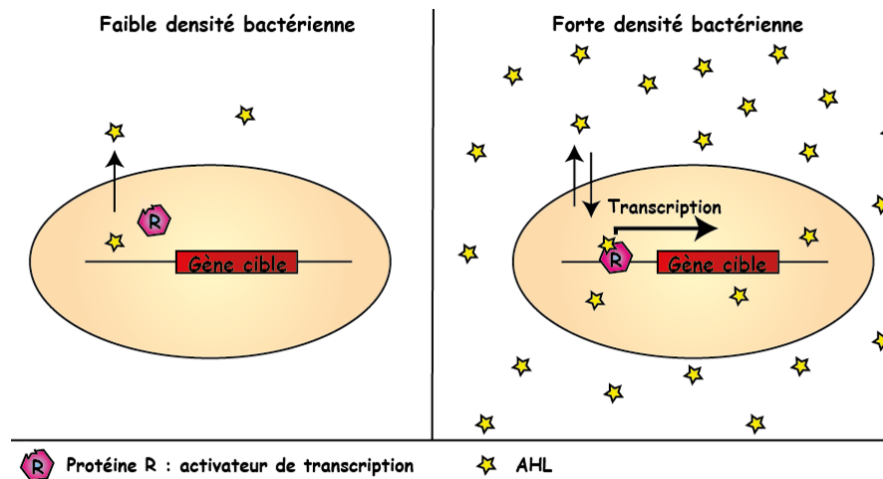


Figure 11 : Réseau de régulation des facteurs de virulence de *P. aeruginosa* d'après (Balasubramanian et al. 2013)

Deux mécanismes de régulation, le quorum sensing et les systèmes de régulation à deux composants, jouent un rôle majeur dans l'adaptation de la bactérie aux conditions environnementales (densité bactérienne, stress, ...). Par exemple, il a été montré que la présence de mucus respiratoire humain dans l'environnement de la bactérie induit le SST6 (du locus 1) grâce à ces mécanismes (Cattoir et al. 2013).

Le **quorum sensing** est un système de communication entre les cellules via de petites molécules, les N-Acyl L Homosérine Lactones (AHL), sécrétées par les bactéries. A des densités cellulaires élevées, la concentration en AHL atteint un seuil au-delà duquel un complexe se forme entre l'AHL et un activateur de transcription, appelé protéine R. Cette interaction conduit à l'induction de la transcription de gènes cibles (Figure 12).





**Figure 12 : Régulation de la transcription de gènes cibles par le quorum sensing**  
*D'après (de Kievit et al. 2000)*

Chez *P. aeruginosa*, il existe plusieurs systèmes de quorum sensing formant un réseau de régulation complexe : le système Las, le système Rhl et un troisième système capable de synthétiser des AHL appelée PQS (pour *Pseudomonas* Quinolone Signal).

Le système Las repose sur l'activateur de transcription LasR et l'AHL nommée PAI-1 [N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone] et produite par LasI. Il permet l'activation de l'expression des gènes codant pour LasI, l'élastase LasB, la protéase alcaline AprA, l'exotoxine A, et de l'autre système de quorum sensing Rhl. Il est important pour la formation de biofilm.

Le système Rhl est constitué par la protéine activatrice RhlR et la molécule auto-inductrice PAI-2 [N-butyryl-L-homoserine lactone], produite par RhlI. Son rôle est de réguler l'expression de *rhlI*, *rhlAB* (codant pour une enzyme nécessaire à la production de rhamnolipides) et de *rpoS*, lui-même impliqué dans le contrôle de l'expression de nombreux gènes du quorum sensing (codant pour l'exotoxine A, les lectines LecA et B, la pyocyanine, ...) et du SST3. Enfin, la molécule de signalisation PQS est impliquée dans la régulation de l'expression de l'élastase, des rhamnolipides, de la pyocyanine (Strateva et al. 2011 ; Mattmann et al. 2010 ; de Kievit et al. 2000).

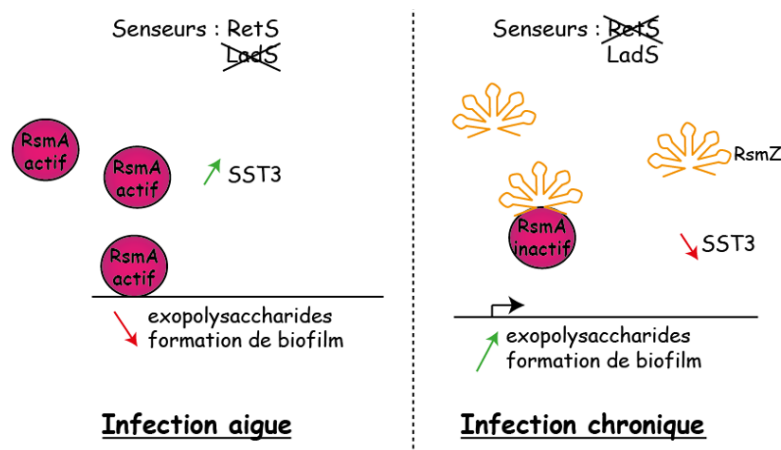
Les **systèmes de régulation à deux composants** sont également des acteurs essentiels de la régulation des facteurs de virulence. Ils sont constitués de deux protéines. La première est un senseur, généralement ancré dans la membrane interne et capable de capter des signaux extérieurs. Il transmet ensuite ce signal via une cascade de phosphorylation à une deuxième protéine, le régulateur de réponse cytoplasmique. Cette dernière est responsable de l'activation ou de la répression de gènes et ARN cibles en fonction de son état de phosphorylation.

L'un des systèmes à deux composants de la bactérie, impliquant les senseurs RetS, LadS et GacS et le régulateur GacA, est connu pour être impliqué dans le passage entre infection chronique et aiguë (Strateva et al. 2011).

Lorsque le senseur GacS est activé, il conduit à la phosphorylation de GacA. En réponse à cette phosphorylation, des petits ARN non codants, appelés RsmY et RsmZ, sont produits et se lient à la protéine RsmA, la rendant inactive. Sous sa forme inactive, cette protéine RsmA n'est plus capable de se lier aux ARNm codant pour des protéines impliquées dans la formation du biofilm ou dans la synthèse des exopolysaccharides. Ainsi, elle ne peut plus empêcher la traduction de ces protéines (Lory et al. 2009), qui sont donc exprimées lorsque RsmA est inactive (Ventre et al. 2006).

Au contraire, lorsque le senseur GacS est inactif, GacA est également inactif et les petits ARN régulateurs RsmY et RsmZ ne sont pas produits. La protéine RsmA est alors sous forme libre et active (Moscoso et al. 2011). Elle permet d'une part l'activation du SST3, et d'autre part la répression de l'expression des protéines associées aux infections chroniques (exopolysaccharides Pel et Psl, formation du biofilm, ...) en interagissant avec l'ARNm correspondant (Figure 13). Dans ce cas, les bactéries ont les caractéristiques phénotypiques présentes lors des phases d'infections aiguës.

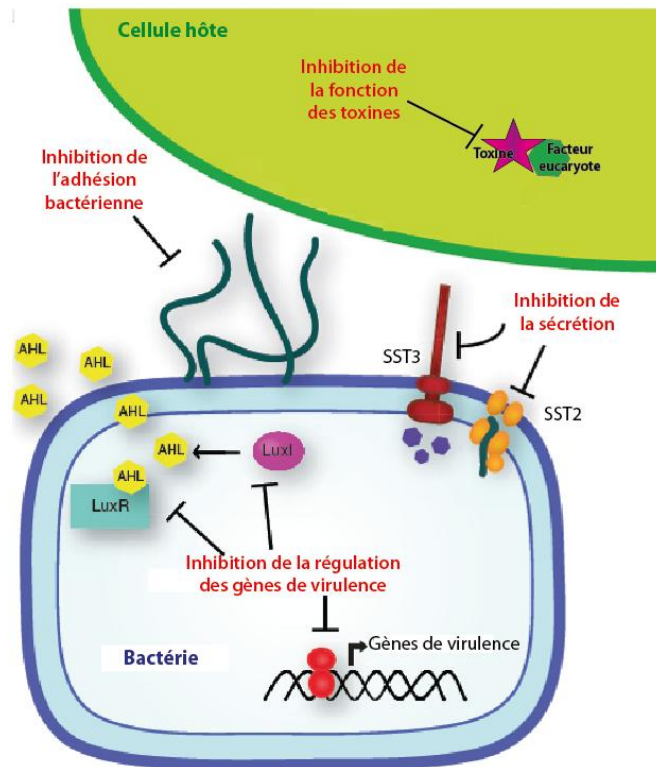
Les senseurs RetS et LadS agiraient de façon opposée sur le senseur GacS. En effet, RetS inhiberait le senseur GacS et les protéines produites seraient celles impliquées dans les infections aiguës, tandis que LadS activerait GacS pour activer la synthèse des protéines caractéristiques des infections chroniques (Figure 13).



**Figure 13 : Régulation de l'expression de facteurs de virulence de *P. aeruginosa* par les senseurs RetS et LadS**  
D'après (Moscoso et al. 2011)

### D. Nouvelles stratégies thérapeutiques anti-infectieuses

Le développement de nouvelles méthodes pour lutter contre *P. aeruginosa* est indispensable, d'autant plus que des multi-résistances aux antibiotiques apparaissent. Comme détaillé précédemment, *P. aeruginosa* possède de très nombreux facteurs de virulence pour coloniser et infecter son hôte. Une perspective pour la découverte de nouvelles solutions pour lutter contre ce micro-organisme est donc le ciblage de ses différents facteurs de virulence. Le blocage de ces diverses « armes » bactériennes peut se faire à différents niveaux (Figure 14).



**Figure 14 : Stratégies d'inhibition des facteurs de virulence de *P. aeruginosa***  
*D'après (Clatworthy et al. 2007)*

Au niveau de la **régulation génétique** tout d'abord, l'expression des gènes de virulence peut être inhibée. Par exemple les molécules de furanones halogénées répriment l'expression des gènes du quorum sensing (Zhu 2002 ; Hentzer et al. 2002). Le triphenyl agit très spécifiquement sur la protéine de quorum sensing LasR, en mimant une AHL (Muh et al. 2006). D'autres études sont cependant nécessaires afin d'identifier les molécules les plus stables possibles et sans effet sur les cellules eucaryotes.

L'inhibition de l'**adhésion** des bactéries aux cellules eucaryotes peut être obtenue via des pilicides empêchant la formation des pili et fimbriae (Ricard 2012). L'utilisation de sucres,

tels que le xylitol, ou bien la combinaison d'extraits de canneberge avec de la ciprofloxacine (un antibiotique), permettent également d'empêcher l'adhésion des bactéries (Sousa et al. 2011 ; Noreddin 2012).

Un autre moyen pour combattre *P. aeruginosa* est le blocage des **appareils permettant la sécrétion des toxines**, notamment les Systèmes de Sécrétion de Type II et III. Par exemple, des molécules pourraient être développées pour interagir avec ces systèmes afin de les bloquer. Les toxines extracellulaires pourraient également être capturées pour empêcher leur accessibilité. Récemment, une classe de molécules, les hydrazones acylées de différents salicyaldéhydes, ont montré une bonne activité inhibitrice du SST3 de différentes espèces bactériennes comme *Yersinia pseudotuberculosis*, *Chlamydia species* ou *Salmonella enterica* (Nordfelth et al. 2005 ; Goguen 2009). Les stratégies d'inhibition du SST3 seront détaillées dans le paragraphe III-C. de ce chapitre.

Enfin, la fonction des **toxines** en tant que telle peut être inhibée, soit directement soit indirectement en agissant sur des facteurs importants pour l'activité de ces enzymes. Un inhibiteur de l'élastase LasB a ainsi été identifié (Cathcart et al. 2011).

Ces stratégies ont pour but d'empêcher la bactérie d'utiliser ses facteurs de virulence mais pourraient s'avérer moins efficaces chez les personnes immunodéprimées. Elles supposent aussi un traitement spécifique à chaque type d'infection et adapté au moment de l'infection (puisque différents facteurs de virulence sont activés au cours de l'infection). Leur principal avantage est la préservation de la flore humaine naturelle et une pression de sélection beaucoup plus faible que lors de l'utilisation d'antibiotiques classiques.

### ***III. Le Système de Sécrétion de Type III***

Présent chez de nombreuses bactéries, le Système de Sécrétion de Type III (SST3) permet la translocation d'exotoxines directement dans le cytoplasme de la cellule eucaryote cible. Il est un facteur majeur de virulence de *P. aeruginosa*, très actif lors d'infections aiguës, lorsque la bactérie se développe sous forme planctonique, mais également actif dans une moindre mesure lors d'infections chroniques (Mikkelsen et al. 2009 ; Diaz et al. 2011 ; O'Callaghan et al. 2011).

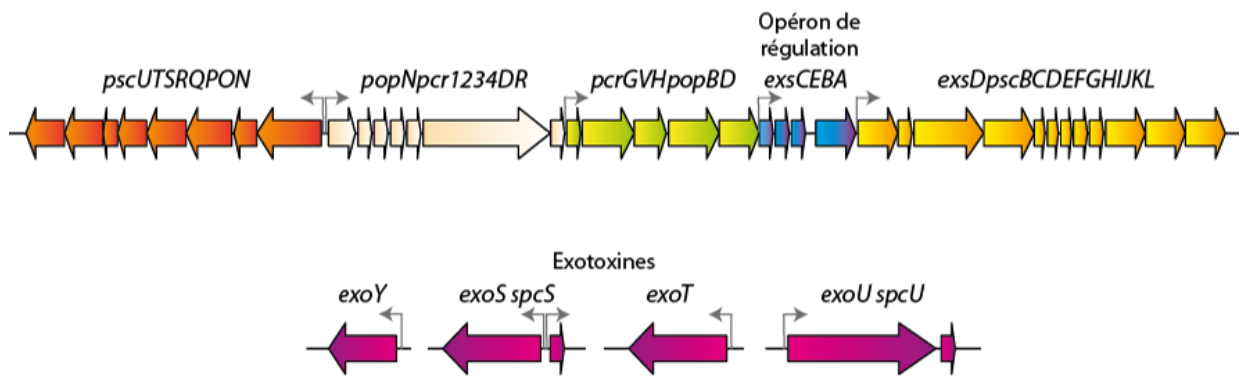
### A. Origines du SST3

Le SST3 est conservé parmi de nombreuses bactéries Gram négatif, des pathogènes principalement mais aussi des symbiotes de mammifères, plantes et insectes. La relation établie entre la bactérie et la cellule dépend de l'activité des exotoxines injectées dans la cellule eucaryote. Chaque espèce bactérienne possède des exotoxines spécifiques (Dean 2011).

Le SST3 est ainsi présent chez *Escherichia coli* enterohémorragique (EHEC) ou enteropathogénique (EPEC), *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* ou *Shigella*, microorganismes provoquant des maladies intestinales chez les humains. Peuvent également être citées *Yersinia pestis*, l'agent responsable de la peste, *Salmonella typhi*, cause de fièvre entérique, ou encore *Bordetella*, microorganisme associé à la coqueluche ou enfin *Chlamydia trachomatis*, à l'origine de maladie sexuellement transmissible (Coburn et al. 2007). Certaines bactéries, comme par exemple *Pseudomonas syringae* ou *Xanthomonas spp.*, présentent une pathogénicité envers les plantes du fait de l'activité de leur SST3 (Buttner et al. 2009). Enfin, parmi les symbiotes possédant un SST3, les bactéries *rhizobium* sont impliqués dans le développement des nodules chez certaines plantes légumineuses (Schulz et al. 2006).

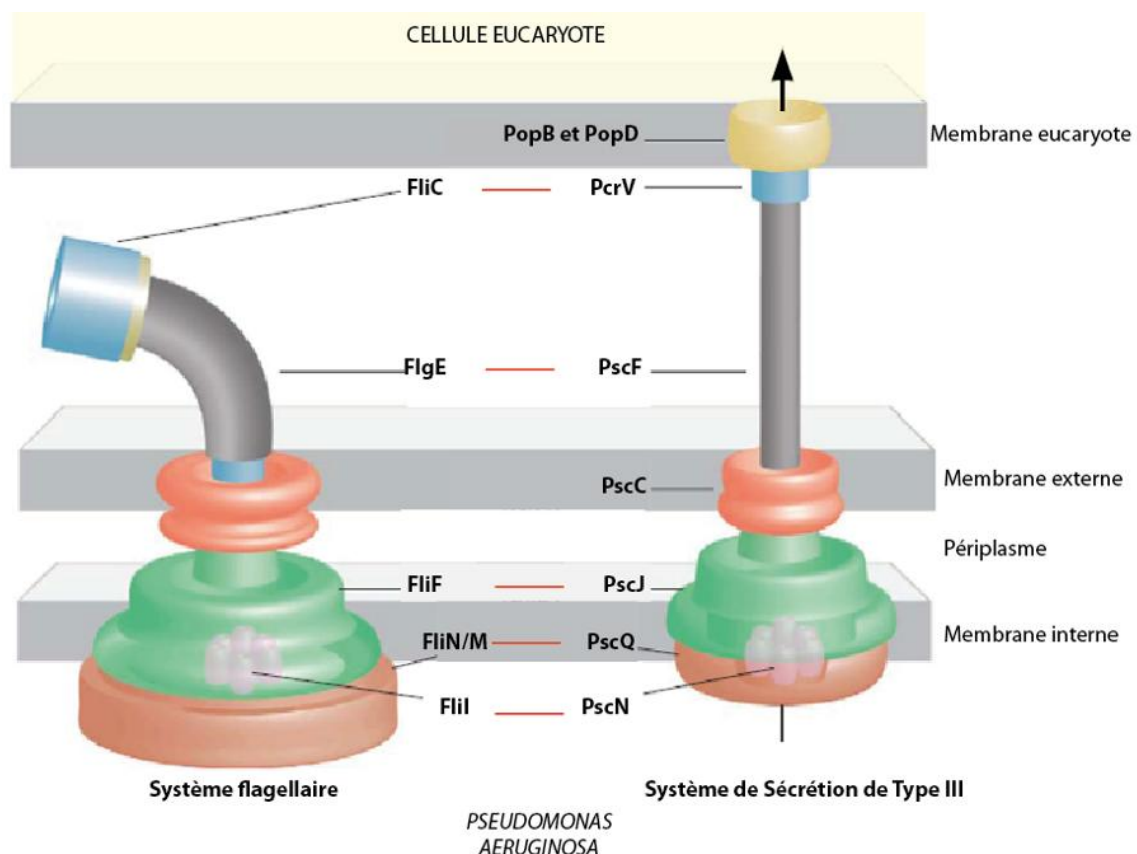
Chez les bactéries, le SST3 a probablement été acquis par transfert horizontal de gènes. En effet, les systèmes sont souvent codés dans des éléments extrachromosomiques ou dans des îlots de pathogénicité. De plus, les séquences d'ADN des SST3 ont souvent une teneur en Guanine et Cytosine différente de celle de l'ADN chromosomique, et sont souvent entourées de restes de séquences d'insertion, de gènes de bactériophages ou d'éléments transposables (Galan et al. 1999).

Chez *P. aeruginosa*, les trente-six gènes codant pour le SST3 sont localisés dans le chromosome bactérien. Les gènes codant pour les protéines impliquées dans l'assemblage du SST3 et dans sa régulation sont regroupés en cinq opérons. Les opérons sont des ensembles de gènes placés sous le contrôle d'un même promoteur. Ils sont donc transcrits en un seul ARN messager et régulés de la même façon. En général, les gènes d'un même opéron ont un rôle dans une même activité. Par contre, les gènes codant pour les exotoxines exoS, T, U, Y et les chaperonnes SpcU et SpcS sont dispersés sur le chromosome (Hauser 2009).



**Figure 15 : Organisation des gènes codant pour le SST3 sur le chromosome de *P. aeruginosa*.**  
*Les promoteurs sont représentés par les flèches grises.*

Le SST3 possède des homologies (Figure et Tableau ci-dessous) avec le système flagellaire, tant au niveau des séquences que des fonctions entre les protéines (Blocker et al. 2003). Des analyses phylogénétiques ont d'ailleurs permis de montrer que ces deux systèmes ont évolué à partir d'un ancêtre commun (Gophna et al. 2003).



**Figure 16 : Similarités structurelles entre le flagelle et le SST3 de *P. aeruginosa***  
*Schéma adapté de (Yip et al. 2006)).*

	Système flagellaire	Injectisome
Substrats	Signal de sécrétion du signal en Nter, chaperonnes cytoplasmiques	
Transport	Rôle de la force proton motrice, transport des substrats partiellement dépliés	
Corps basal	Assemblé en premier, dans les membranes	
	40 nm de diamètre, C-ring (FliG, FliM, FliN) impliqué dans la rotation	20 nm de diamètre, C ring : PscQ
ATPases	Structures hexamériques, rôle dans le dépliement des substrats	
	Assemblage du flagelle	Rôle probable de séparation des complexes chaperonnes/substrats
Aiguilles	Propriétés hélicales : 5,6 sous-unités par tour, 1 start helix, helical pitch 2,4 nm	
	- Hook flexible (sous-unités de FlgE, 42kDa) - Filament raide de 10-15 µm de long, 23 nm de diamètre et 2 nm de diamètre interne, 20000 à 30000 sous-unités de flagelline FliC (51 kDa)	60 nm de long, raide, 7nm de diamètre et environ 1,5 nm de diamètre interne, 100-150 sous-unités de PscF (9kDa)
Protéines de pointe	5 unités	
	Rôle : auto-assemblage et polymérisation de la flagelline	Rôle : plateforme pour l'assemblage du pore de translocation

**Tableau 2 : Caractéristiques communes et différences entre le système flagellaire et le SST3 de *Pseudomonas aeruginosa***  
*Tableau adapté de (Erhardt et al. 2010)*

Le SST3 et le système flagellaire sont régulés de façon opposée, c'est-à-dire que le système flagellaire est moins exprimé et les bactéries moins mobiles lorsque le SST3 est très actif et vice versa (Soscia et al. 2007).

Certaines protéines de ces deux systèmes seraient même capables d'interagir entre elles, du fait des fortes similarités (Stone et al. 2010).

## B. L'assemblage du système

Le SST3 est constitué de plus de vingt protéines, qui s'assemblent en une « seringue moléculaire », appelée l'injectisome, traversant les deux membranes bactériennes et la membrane de la cellule eucaryote cible. Très conservé structurellement et fonctionnellement chez de nombreuses bactéries Gram négatif, il est composé par plusieurs sous-ensembles protéiques (Blocker et al. 1999) :

- une protrusion cytoplasmique,
- le corps basal, au niveau des membranes bactériennes,
- l'aiguille de sécrétion, à l'extérieur de la bactérie,
- le translocon, inséré dans la membrane eucaryote.



Le SST3 permet l'injection d'effecteurs dans le cytoplasme de la cellule hôte. Avant leur sécrétion, les substrats du SST3 sont en général maintenus en association avec des chaperonnes spécifiques dans le cytoplasme bactérien.

Les injectisomes de plusieurs espèces bactériennes ont pu être purifiés et observés par microscopie électronique (Figure 17).

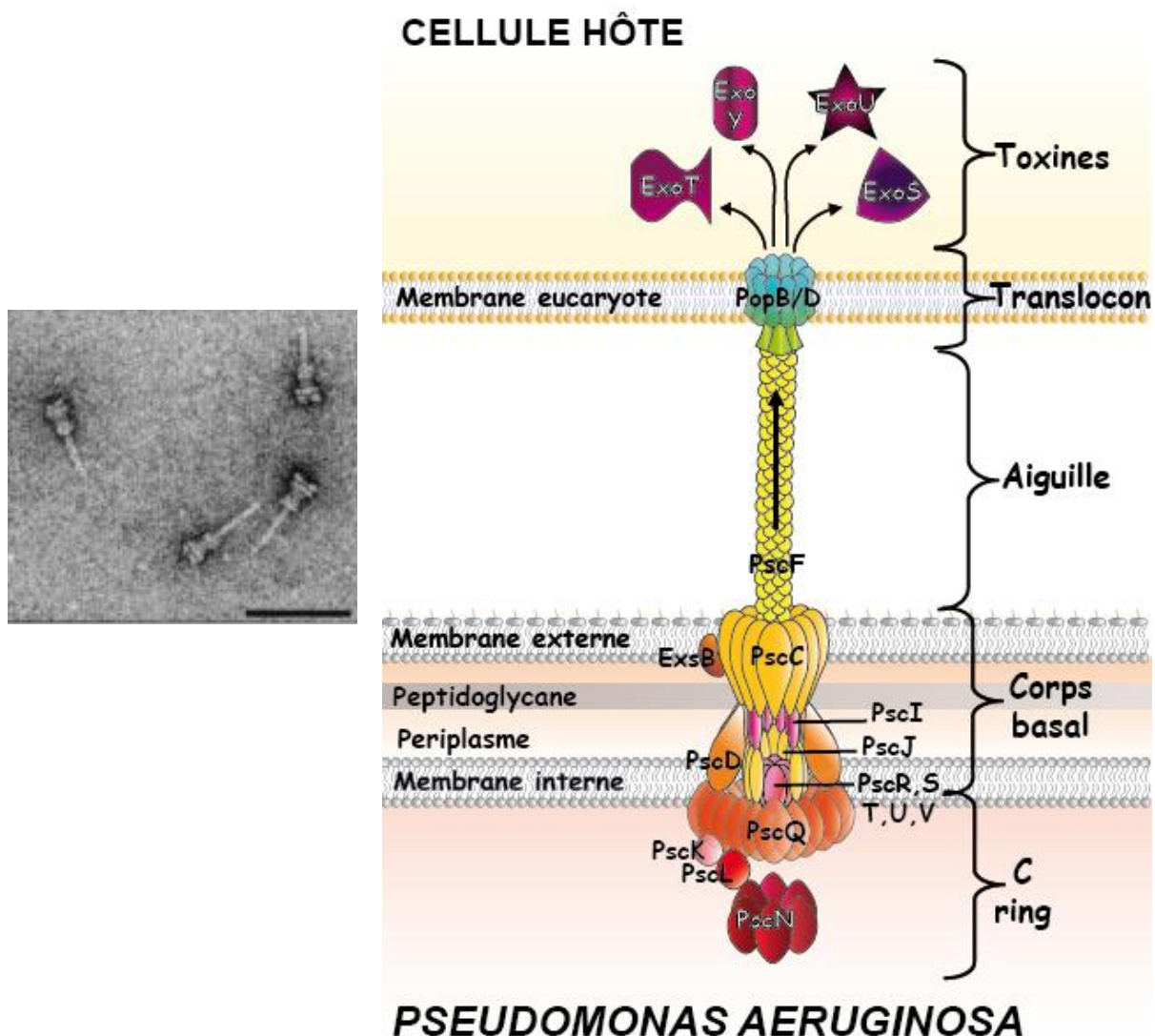


Figure 17 : Le SST3

a) Cliché de microscopie électronique du SST3 de *Shigella flexneri*. La barre mesure 100 nm (Blocker et al. 2001).

b) Schéma hypothétique du SST3 de *P. aeruginosa*.



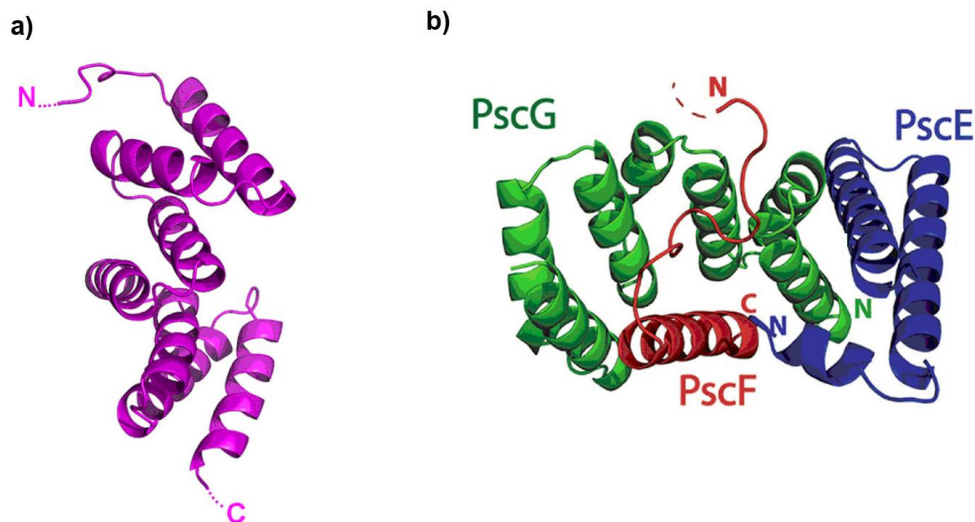
### 1) *Les chaperonnes cytoplasmiques*

Dans le cytoplasme bactérien, les différents substrats du SST3 sont maintenus inactifs et sous forme partiellement dépliée par des chaperonnes spécifiques. L'interaction entre les substrats et leurs chaperonnes est facilitée par la proximité de leurs gènes, et donc des protéines nouvellement synthétisées. Il existe au moins trois classes de chaperonnes impliquées dans la prise en charge des substrats du SST3 (Wilharm et al. 2007).

Les chaperonnes de classe I ont une structure conservée malgré une séquence très variable. Elles peuvent se lier à un substrat unique (classe IA) ou bien à plusieurs substrats (classe IB). Leurs substrats sont notamment les effecteurs du SST3. Elles se présentent sous forme dimériques pour lier une séquence située dans les 80 acides aminés Nterminaux de leur substrat (Akeda et al. 2005). En particulier, les chaperonnes IB reconnaissent la séquence consensus (L ou M ou I ou F)XXX(I ou V)XX(I ou V)XN (Costa et al. 2012). Lorsque la chaperonne interagit avec son substrat, le domaine de liaison du substrat passe généralement d'un état désordonné à un état ordonné (Rodgers et al. 2010 ; Rodgers et al. 2008). En l'absence de chaperonnes, les substrats sont sécrétés de façon non spécifique par l'appareil flagellaire ou rapidement dégradés (Lee et al. 2003 ; Fu et al. 1998). Parfois, la traduction de l'effecteur est initiée seulement lorsque sa chaperonne a été traduite. C'est par exemple le cas du complexe chaperonne-effecteur SicP-SptP chez *Salmonella* (Button et al. 2011).

Les chaperonnes de classe II interagissent avec les protéines appartenant à une partie bien définie du SST3, appelée le translocon. La chaperonne PcrH possède un domaine avec un repliement tétratricopeptide (TPR), dont la structure est en forme de coupe (Figure 18). La région concave de cette région TPR est le siège de l'interaction soit avec le domaine N-terminal de la protéine mineure du translocon PopD soit avec la protéine majeure PopB (Job et al. 2010 ; Broms et al. 2006). Les complexes de ratio 1 :1 sont ainsi formés entre la chaperonne et son substrat (Faudry et al. 2006).

Enfin, la seule chaperonne hétérodimérique de classe III, constituée de PscE et de PscG, empêche la polymérisation prématurée de l'aiguille. Le domaine TPR de PscG permet de capturer le domaine C terminal de la protéine de l'aiguille dans sa région concave mais aussi d'interagir avec PscE par sa région convexe, comme montré sur la Figure 18 (Quinaud et al. 2005).



**Figure 18 : Structures de chaperonnes cytoplasmiques du SST3.**

*a) Structure de la chaperonne PcrH, avec son domaine TPR (Job et al. 2010)*

*b) Structure de la chaperonne hétérodimérique PscE-PscG en bleu et vert avec son substrat PscF en rouge (Quinaud et al. 2005).*

### 2) La base cytoplasmique du SST3 : le C-ring

L'ATPase PscN (pour **P**seudomonas **S**ecretion **C**omponent) du système de sécrétion est localisée dans le cytoplasme mais est associée à la membrane interne. Elle s'assemble sous forme d'hexamère et a un rôle essentiel dans l'activité du SST3. Il a été proposé qu'elle soit impliquée dans l'apport d'énergie pour la sécrétion des protéines ou qu'elle ait un rôle dans le dépliement des protéines à exporter et dans leur dissociation de leurs chaperonnes cytoplasmiques. Les caractéristiques et activités potentielles de l'ATPase seront développées dans la partie suivante. L'ATPase a deux partenaires, la protéine PscK et le régulateur PscL, qui inhibe son activité (Blaylock et al. 2006). Ce complexe interagit avec un anneau cytoplasmique constitué par oligomérisation de PscQ, appelé l'anneau cytoplasmique ou C-ring (Cornelis 2006 ; Morita-Ishihara et al. 2006).

### 3) Le corps basal

Le corps basal du SST3 est composé de structures annulaires insérées dans les membranes interne et externe de la bactérie. Son assemblage en une structure cylindrique de 300Å de hauteur et 240Å de large a été étudié chez les bactéries *Yersinia spp.*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* et EPEC (Marlovits et al. 2004 ; Blocker et al. 2001) et est très conservé. Les trois principales protéines de la base sont PscC dans la membrane externe et PscD et PscJ dans la membrane interne.

Dans la membrane interne, la protéine PscD s'assemblerait en un complexe d'environ 18 sous-unités. Son domaine cytoplasmique interagirait avec la lipoprotéine PscJ (Gamez et al. 2012). L'oligomère de PscJ serait constitué de 24 sous-unités, ancrées à la membrane externe par lipidation N-terminale et insérées dans la membrane interne. La structure annulaire ainsi formée mesure 180Å de diamètre et 52Å de haut (Crepin et al. 2005 ; Yip et al. 2005). Les protéines PscR, S, T, U et V seraient également insérées dans la membrane interne (Zenk et al. 2007). Dans le périplasme, la tige interne composée de 5 à 10 sous-unités de PscI serait impliquée dans le changement de la spécificité des substrats (Yip et al. 2005).

L'anneau de la membrane externe est constitué d'un complexe de 12 à 14 sous-unités de sécrétine PscC, comme détaillé dans la partie 2) de ce chapitre.

Les différents composants de la base du SST3 sont exportés par la voie générale de sécrétion Sec (Burns et al. 2008). Chez les bactéries, deux voies permettent le passage de protéines à travers la membrane cytoplasmique des bactéries : la voie Sec et la voie Tat. La voie Sec transporte les protéines sous forme dépliée, tandis que la voie Tat les transporte déjà repliées. Les protéines du corps basal du SST3 seraient donc acheminées à travers la membrane interne sous forme dépliée (Manting et al. 2000 ; Natale et al. 2008).

Enfin, la protéine PscI, la tige interne du système, sert de base pour la polymérisation de l'aiguille et est importante pour la stabilité de l'aiguille (Ghosh 2004).

#### 4) *L'aiguille de sécrétion*

Indispensable à l'injection des effecteurs dans la cellule eucaryote, l'aiguille de sécrétion mesure 60 à 80 nm de long, 6 à 7 nm de diamètre externe et environ 2,7 nm de diamètre interne. Elle est formée par oligomérisation d'environ 140 sous-unités de la petite protéine PscF, dans le prolongement de la tige interne (Pastor et al. 2005). Cette protéine présente 69% de similarité avec la protéine de l'aiguille chez *Yersinia spp.*, suggérant une homologie d'assemblage et de fonction. L'aiguille s'assemblerait en une structure hélicoïdale, comprenant 11 sous-unités de PscF en 2 tours (Loquet et al. 2012). L'orientation de la protéine PscF dans l'aiguille est toujours controversée : certains auteurs ont montré que l'hélice  $\alpha$  sur la face interne de l'aiguille est constituée par le domaine Nterminal (Fujii et al. 2012) tandis que d'autres ont démontré qu'il s'agit du domaine Cterminal (Loquet et al. 2012). La présence d'une mutation L54V bloque la sécrétion des sous-unités de YscF et par

conséquent la sécrétion des substrats suivants, bien que les propriétés biochimiques de la protéine restent identiques *in vitro* (capacité à oligomériser, taille, ...) (Davis et al. 2010).

PscF a la capacité de polymériser spontanément en solution. Deux chaperonnes, PscE et PscG, empêchent la polymérisation prématurée de l'aiguille dans le cytoplasme bactérien, comme expliqué dans la partie III-B-1). Elles sont indispensables à la formation du complexe de sécrétion de type III (Quinaud et al. 2005).

La taille de l'aiguille est finement contrôlée. Malgré une longueur similaire, le contrôle de la taille de l'aiguille est différent chez *Yersinia* de chez *Shigella* et *Salmonella*. Chez ces dernières bactéries, il dépend de l'assemblage de la tige interne (Marlovits et al. 2006). Chez *P. aeruginosa*, la protéine PscP pourrait être, comme son homologue YscP chez *Yersinia*, la « règle moléculaire » du système. En effet, la taille de cette protéine ainsi que sa teneur en hélices est directement corrélée à la longueur de l'aiguille (Journet et al. 2003) ; (Wagner et al. 2009). La sécrétion d'une seule protéine de YscP permet de contrôler la taille de l'aiguille (Agrain et al. 2005 ; Wagner et al. 2010). Elle serait liée à la fois à la base du SST3, via un partenaire protéique qui pourrait être YscU, et à l'extrémité de l'aiguille grandissante par son domaine N-terminal, via un partenaire inconnu ou bien en étant accrochée en haut de l'aiguille telle une ombrelle (Wagner et al. 2010).

Environ 50 à 100 aiguilles par bactéries ont été dénombrées chez *Yersinia enterocolitica* (Ghosh 2004 ; Hoiczky et al. 2001).

### 5) *Le translocon*

Le translocon, situé en haut de l'aiguille, est constitué de trois protéines : les protéines hydrophobes PopB et PopD (pour **P**seudomonas **O**uter **P**rotein) et la protéine hydrophile PcrV (pour **P**seudomonas Low **C**alcium **R**esponse).

Les protéines PopB, de 45 kDa, et PopD, de 31 kDa, possèdent deux régions et une région transmembranaires respectivement (Goure et al. 2004). Elles s'assemblent en oligomère pour former un pore de 40Å de diamètre interne et de 80Å de diamètre externe dans la membrane eucaryote cible, à l'extrémité de l'aiguille (Schoehn et al. 2003). Elles ont en effet la capacité de former des anneaux spontanément dans des membranes, y compris *in*

*vitro* sur des liposomes dont la composition est proche des membranes eucaryotes (présence de cholestérol et de phospholipides tels que la phosphatidylsérine) (Schoehn et al. 2003).

Les mutants de *P. aeruginosa* délétés des gènes correspondants, *popB* et *popD*, sont non cytotoxiques envers les cellules eucaryotes. Les deux protéines sont donc indispensables à la translocation (Goure et al. 2004). D'après des modèles d'infections pulmonaires réalisées sur des souris par des souches ne possédant pas d'exotoxines, PopB semble même avoir un rôle direct dans la pathogénicité. En effet, la présence de PopB conduit à une augmentation de la mortalité des souris, à une diminution de la clairance bactérienne, et à une mort des macrophages par nécrose pro-inflammatoire avec une perméabilisation membranaire (Galle et al. 2012). En l'absence de PopD, la protéine PopB s'insère toujours dans la membrane mais cela n'est pas suffisant pour permettre la translocation.

Dans le cytoplasme bactérien, PopB et PopD sont maintenus à l'état monomérique par leur chaperonne commune, PcrH, à laquelle ils s'associent dans un ratio 1:1, comme expliqué dans la partie III-B-1) de ce chapitre (Faudry et al. 2006 ; Schoehn et al. 2003 ; Job et al. 2010). Le domaine transmembranaire de PopD est capturé au cœur de la chaperonne (Faudry et al. 2007).

La protéine PcrV, de 32kDa, est la protéine située à la pointe du système. Elle s'assemble en un pentamère, en forme de cloche, à l'extrémité de l'aiguille (voir Figure 14) (Mattei et al. 2011 ; Cornelis 2006).

Outre son rôle très important dans la virulence, elle est indispensable à la formation du pore dans la membrane eucaryote. En son absence, la protéine PopB s'insère correctement dans la membrane eucaryote mais pas PopD, et les effecteurs sont sécrétés dans le milieu extracellulaire au lieu d'être injectés dans le cytoplasme de la cellule cible (Goure et al. 2004 ; Nordfelth et al. 2001 ; Gebus et al. 2008). De plus, la liaison de PcrV à PcrG lors de l'activation du système permettrait de débloquent la porte de sécrétion (Nanao et al. 2003).

#### 6) Les exotoxines

Les exotoxines ExoS, T, U et Y sont injectées dans le cytoplasme de la cellule eucaryote afin de détourner ses principales fonctions. Leurs activités ont été décrites plus précisément dans la partie II-B-6). Ces toxines possèdent un signal de sécrétion à l'extrémité N terminale, constitué d'une séquence dégénérée et de structure désordonnée de 10-15 résidus. Ce signal est suffisant pour la sécrétion mais pas pour la translocation dans la cellule

cible. Le domaine de liaison à la chaperonne, présent dans les 80 premiers acides aminés, est nécessaire à la translocation (Rodgers et al. 2010).

La chaperonne SpcS (pour Specific Pseudomonas Chaperone for ExoS) interagit avec les exotoxines ExoS et ExoT, tandis que la protéine SpcU est la chaperonne de ExoU (Shen et al. 2008 ; Finck-Barbancon et al. 1998).

### C. Importance du SST3 lors d'infections et enjeux thérapeutiques

La présence d'un SST3 actif est associée avec de mauvais pronostics cliniques et à des infections plus graves. En effet, 89% des isolats cliniques provenant d'infections pulmonaires aiguës possèdent le SST3 contre seulement 41% des isolats de patients atteints de mucoviscidose (Roy-Burman et al. 2001 ; Ledizet et al. 2012).

De plus, diverses études ont démontré l'implication du SST3 dans la sévérité de l'infection. Ainsi, chez les patients atteints de bactériémie, des chocs septiques ont lieu chez 43% des personnes infectées par des souches ayant un SST3 fonctionnel et chez seulement 23% des autres personnes. Dans le cas de bactériémie comme de pneumonie acquise sous ventilation mécanique, la sécrétion de la protéine PcrV est directement corrélée avec une mortalité accrue. Cette corrélation est renforcée lorsque l'une des toxines ExoS, ExoT ou ExoU est sécrétée (Zhuo et al. 2008 ; Roy-Burman et al. 2001 ; Hauser et al. 2002). L'importance du SST3 lors d'infections aiguës a également été observée *in vitro* sur des modèles d'infection (Sun et al. 2012 ; Sawa et al. 1998).

Enfin, les traitements déployés sont peu efficaces contre les souches ayant un SST3 actif, quelque soit le profil de résistance aux antibiotiques (El-Solh et al. 2012).

Etant donné l'incidence négative du SST3 à la fois sur la mortalité et la morbidité, il est important de comprendre le fonctionnement de ce système afin de développer de nouveaux médicaments pour lutter contre la bactérie.

Une première étude a révélé qu'un composé dérivé de benzimidazole est un inhibiteur efficace de ExsA, l'activateur transcriptionnel du SST3. Cette molécule est capable d'inhiber l'activité du SST3 et la virulence dans des modèles de pneumonies chez les souris (Gay 2007). D'autres études ont été menées sur différentes espèces bactériennes, telles que *P. aeruginosa*, *Yersinia spp.*, *Chlamidiae spp.*, *S. flexneri* ou *Salmonella spp.*, afin d'identifier des inhibiteurs bloquant l'activité du SST3 (Aiello et al. 2010 ; Keyser et al. 2008 ; Pan et al. 2007).

Pour cela, des chimiothèques ont été criblés afin de détecter les molécules chimiques permettant d'inhiber la sécrétion des effecteurs, ainsi que l'injection des effecteurs dans les cellules cibles et/ou la cytotoxicité dépendant du SST3. Les molécules de la famille des sulfonylaminobenzanilides ainsi qu'une phenoxyacetamide sont prometteuses mais d'autres essais sont nécessaires pour valider leur efficacité et les optimiser.

Récemment, un thiadiazinon a été synthétisé, basé sur les inhibiteurs du SST3 déjà existants. Il permet d'inhiber l'infection des bactéries de la famille des *Chlamydiae* (Zigangirova et al. 2012).

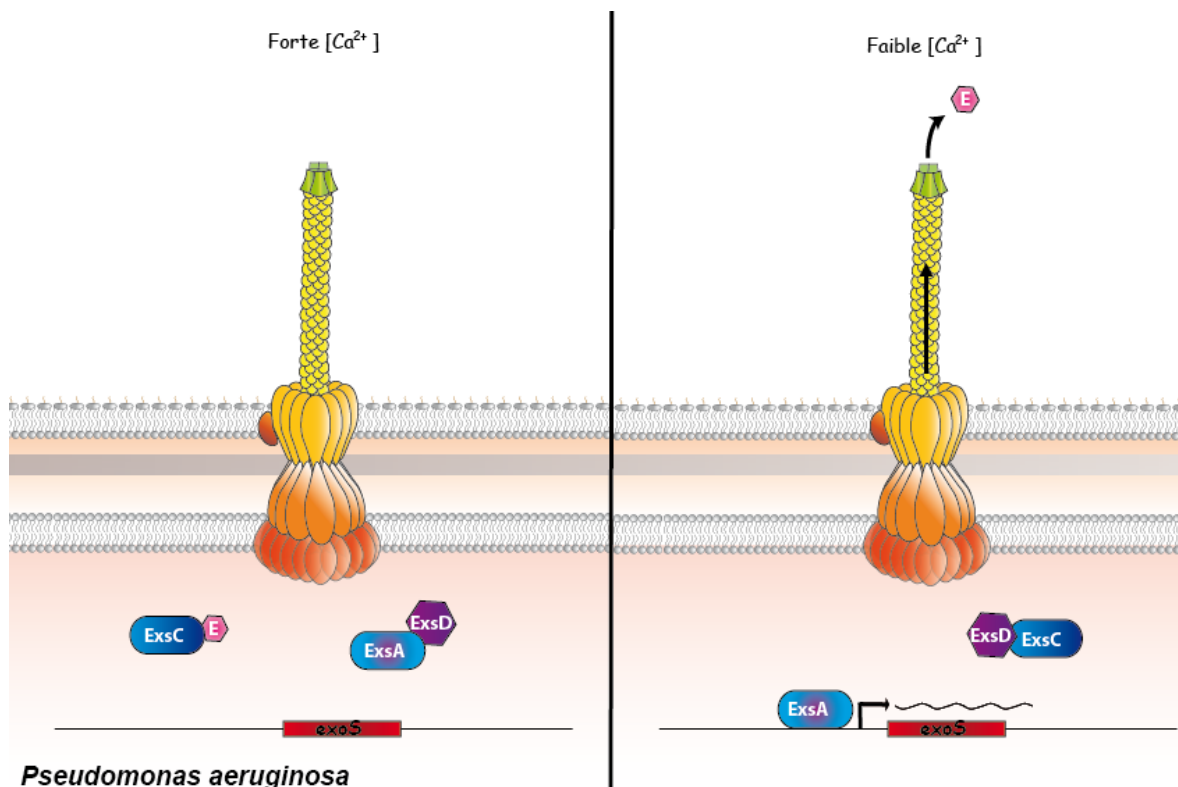
Enfin, un facteur anti-microbien produit naturellement par les cartilages humains, le CA-AMF (pour Cartilage Associated Antimicrobial Factor), est particulièrement efficace contre les souches de *P. aeruginosa* possédant un SST3 fonctionnel (Mahmood et al. 2013).

Une autre stratégie est la vaccination par des protéines du SST3. La protéine de la pointe de l'aiguille, PcrV, s'est montrée efficace dans des modèles animaux (Song et al. 2012). Des essais ont aussi été réalisés pour mettre au point un vaccin multivalent, contenant les protéines de la pointe de plusieurs pathogènes bactériens (Markham et al. 2010). Enfin, la vaccination par des souches de *Yersinia pestis* délétées de l'ATPase du SST3, appelées  $\Delta yscN$  confère une protection convenable à des souris (Bozue et al. 2012). En effet, les souris vaccinées 60 jours avant l'infection par injections de doses allant de  $10^3$  à  $10^6$  bactéries  $\Delta yscN$  ont un taux de survie 21 jours post infection allant de 60% à 90% (selon la dose de bactéries utilisées pour la vaccination), alors qu'aucune des souris non vaccinée n'a survécu (Bozue et al. 2012).

#### **D. Régulation et activation du SST3**

Le SST3 est activé lors du contact de la bactérie avec une cellule eucaryote (Vallis et al. 1999). Le système est alors assemblé et les effecteurs sont sécrétés directement dans la cellule cible. Le SST3 peut également être induit de façon artificielle *in vitro* par une déplétion en calcium ou bien dans une moindre mesure par la présence de sérum (Mattmann et al. 2010 ; Yahr et al. 1994). Il est également possible de stimuler la sécrétion par une forte concentration en sel NaCl (Hornef et al. 2000). Par ailleurs, la toxine ExoS contrôlerait sa propre translocation, c'est-à-dire qu'elle permettrait d'inhiber sa translocation une fois que les cellules eucaryotes sont intoxiquées (Cisz et al. 2008).

D'un point de vue moléculaire, la cascade de régulation transcriptionnelle implique quatre protéines, ExsA, ExsC, ExsD et ExsE (Figure 19). La protéine ExsA, appartenant à la famille des régulateurs transcriptionnels de XylS-AraC est l'activateur des gènes du SST3 (Hovey et al. 1995). Lorsque le SST3 n'est pas induit, les protéines ExsC et ExsE forment un complexe dans le cytoplasme tandis que la protéine ExsD forme un complexe 1:1 avec l'activateur ExsA, bloquant ainsi l'activation de la transcription des gènes du SST3 (Thibault et al. 2009). Lors de l'activation du SST3, la protéine ExsE est sécrétée par l'aiguille du système (Rietsch et al. 2005). La protéine ExsC est alors disponible et interagit avec une forte affinité avec ExsD, libérant ainsi l'activateur ExsA. ExsA se lie finalement à l'ADN pour activer la transcription des gènes du SST3 (Brutinel et al. 2008).

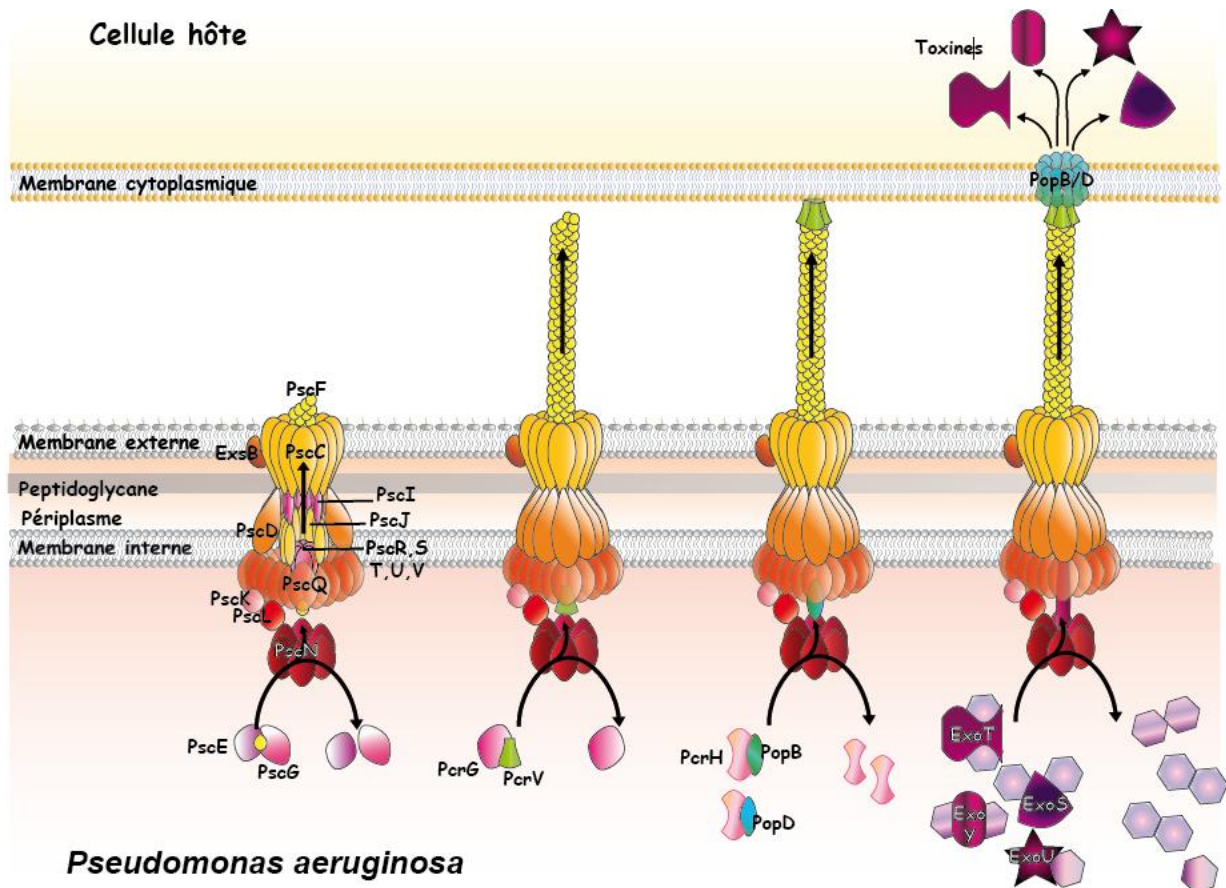


**Figure 19 : Activation du SST3 chez *P. aeruginosa* en réponse à de faibles concentrations en calcium**  
(Schéma adapté de (Rietsch et al. 2005))

### E. Hiérarchie d'assemblage du SST3

L'assemblage du SST3 s'effectue en plusieurs étapes finement contrôlées (Deane et al. 2010). Les principales étapes sont décrites dans la figure ci-dessous.





**Figure 20 : Principales étapes de l'assemblage du SST3 de *P. aeruginosa*.**  
*Ce modèle est hypothétique. Les substrats à sécréter sont séparés de leurs chaperonnes puis exportés. L'activité ATPase serait indispensable pour cette étape. L'aiguille serait tout d'abord assemblée par oligomérisation des sous-unités PscF, puis la protéine de pointe PcrV serait transportée à l'extrémité de l'aiguille. Ensuite le pore de translocation, constitué de PopB et PopD serait formé et permettrait de perforer la membrane de la cellule eucaryote. Enfin, les toxines seraient sécrétées dans le cytoplasme eucaryote.*

Plusieurs modèles, parfois incompatibles, ont été proposés pour expliquer le changement des substrats une fois que le bloc précédent est assemblé. Les mécanismes de changement des substrats peuvent également différer d'une espèce à l'autre. Dans ce cas, seuls les modèles proposés chez *Yersinia*, dont le SST3 est très proche de celui de *P. aeruginosa*, seront abordés.

La première étape est l'insertion de la base du système dans les membranes. Par homologie avec des études menées chez *Yersinia*, les premiers éléments à être localisés seraient la sécrétine PscC dans la membrane externe et les protéines majeures de la membrane interne PscD et PscJ. S'ajouteraient ensuite les composants cytosoliques, c'est-à-dire l'anneau cytosolique PscQ, l'ATPase et les protéines interagissant avec elle (Diepold et al. 2010).

D'après une étude réalisée chez *Salmonella*, le complexe de protéines homologues à PscQ-K-L constituerait une plateforme de tri pour préparer les substrats à sécréter dans le bon ordre. Ce complexe reconnaîtrait les chaperonnes des différents substrats (Lara-Tejero et al. 2011). Cette plateforme peut également inclure d'autres protéines, telles que l'ATPase du système. Les protéines homologues à PscQ et à l'ATPase PscN interagissent d'ailleurs avec des substrats de sécrétion du SST3 chez de nombreuses espèces bactériennes, telles que *E. coli*, *Salmonella* ou *Shigella* (Morita-Ishihara et al. 2006 ; Spaeth et al. 2009 ; Biemans-Oldehinkel et al. 2011 ; Johnson et al. 2008 ; Boonyom et al. 2010 ; Lorenz et al. 2012).

L'étape suivante est l'assemblage de la tige interne et de l'aiguille (Marlovits et al. 2010). Outre la règle moléculaire PscP, chargée de contrôler la taille de l'aiguille, la protéine PscU serait aussi impliquée dans le changement de spécificité des substrats. Des études ont montré que la protéine homologue à PscU chez *Yersinia*, localisée dans la membrane interne, a la particularité de posséder une boucle cytosolique autoclivable en son extrémité C-terminale. L'inhibition de son autoclivage conduit à des aiguilles de tailles variées et à une absence de sécrétion des translocateurs. L'autoclivage de PscU serait donc responsable du changement de spécificité des substrats pour débloquer la sécrétion des translocateurs (Bjornfot et al. 2009). L'autoclivage de PscU pourrait survenir lorsque l'aiguille a atteint la taille prévue par PscP, comme proposé dans un premier modèle. L'information serait transmise à PscU via une autre protéine cytoplasmique, PscO (Riordan et al. 2008). Selon un autre modèle, le changement de spécificité des substrats serait contrôlé par l'achèvement de la tige interne, PscI, et non pas de l'aiguille en tant que telle. Ce changement serait toujours effectué par PscP et PscU via la régulation de la sécrétion de la tige interne PscI (Wood et al. 2008).

Une fois la formation de l'aiguille accomplie, les protéines de la pointe et du pore de translocation sont exportées. Lors du contact avec la cellule cible, il a été proposé que le pore s'insère dans la membrane eucaryote. La sécrétion des effecteurs serait ensuite déclenchée par un changement conformationnel à la pointe de l'aiguille, qui serait transmis le long de l'aiguille puis de la tige interne jusqu'à une protéine appelée PopN (Cherradi et al. 2013 ; Dewoody et al. 2013). Cette dernière interagirait avec la tige interne et avec Pcr1 dans le cytoplasme. Tout comme les protéines PcrV et PcrG, elles contribueraient à inhiber l'expression et la sécrétion des effecteurs tant qu'il n'y a pas contact avec la cellule cible (Lee et al. 2010 ; Sundin et al. 2004 ; Yang et al. 2007 ; Yang et al. 2007).

La sécrétion de PopN a ensuite pour conséquence de débloquer la sécrétion des effecteurs (Pallen et al. 2005).

#### **IV. L'ATPase du SST3**

L'ATPase PscN de *P. aeruginosa* a un rôle primordial dans l'activité du SST3. Elle présente de fortes homologues avec les ATPases de la superfamille AAA (pour ATPases associated with diverse cellular activities) ainsi qu'avec diverses familles d'enzymes telles que la sous-unité  $\beta$  des ATPases  $F_0F_1$  et l'ATPase du système flagellaire.

L'ATPase du SST3 a pu être caractérisée d'un point de vue enzymatique et biochimique chez certaines espèces bactériennes, chez qui elle prend en charge les complexes chaperones-effecteurs pour les préparer à leur sécrétion.

Cependant, de nombreuses questions subsistent quant à son activité précise. Par exemple, son implication dans la prise en charge des complexes chaperones-substrats du SST3 autres que les effecteurs, ou bien son rôle dans la spécificité des substrats, ou encore sa participation à la sécrétion en tant que telle ne sont pas connus. Enfin, étant donné son importance dans le fonctionnement du SST3, des applications thérapeutiques basées sur l'inhibition de son activité sont envisagées.

##### **A. Caractéristiques de l'ATPase du SST3**

Les ATPases sont des enzymes présentes dans tous les organismes vivants, des cellules eucaryotes aux procaryotes. Elles sont capables de catalyser la réaction suivante de synthèse ou d'hydrolyse de l'Adénosine Tri Phosphate (ATP) en Adénosine Di Phosphate (ADP) :  $ATP \leftrightarrow ADP + \text{phosphate}$ . L'énergie libérée lors de l'hydrolyse de l'ATP peut ensuite être utilisée pour catalyser une autre réaction. Le site de liaison de l'ATP est très conservé. Il consiste en une séquence consensus d'acides aminés, appelée Walker A : Glycine-X-X-X-X-Glycine-Lysine-(Thréonine ou Sérine). Le site catalytique permettant l'hydrolyse de l'ATP est situé dans la séquence Walker B : (Arginine/Lysine)-X-X-X-X-Glycine-X-X-X-X-Lysine-h-h-h-h-acide aspartique, où h représente un acide aminé hydrophobe (Wiese et al. 2006) ; (Gomez et al. 2002).

Les ATPases des SST3 sont indispensables au fonctionnement du système. Elles ont été étudiées chez quelques microorganismes, apportant des indications sur leur mode de fonctionnement et leurs cibles probables.

### 1) *Similarités entre diverses ATPases*

Les ATPases sont très conservées parmi les SST3, avec 40-50% d'identité de séquence d'acides aminés (Zarivach et al. 2007). La Figure 21 présente un alignement entre les séquences de l'ATPase PscN du SST3 de *P. aeruginosa* et ses homologues.

Les ATPases des SST3 bactériens présentent de fortes similarités de séquence, mais aussi de structure et d'activité, avec les ATPases des systèmes flagellaires et dans une moindre mesure avec les ATPases de la famille AAA ou bien avec la sous-unité  $\beta$  des ATPases  $F_0F_1$ .

Les ATPases de la famille AAA ont, comme leur nom l'indique, un rôle important dans différentes activités cellulaires. Elles sont par exemple impliquées dans la protéolyse, le repliement des protéines, le transport membranaire, la réplication de l'ADN, ... Pour cela, leurs fonctions peuvent être de déplier les protéines, de désassembler des complexes stables protéine-protéine, ou bien de servir de moteur moléculaire. Elles sont généralement assemblées en hexamère, avec parfois une septième unité différente. Cette oligomérisation permet d'augmenter leur activité enzymatique. De plus, la liaison des ATPases avec leurs protéines cibles est très forte en présence d'ATP mais faible en présence d'ADP, c'est-à-dire une fois qu'elles ont hydrolysé l'ATP (Vale 2000).

Les ATPases  $F_0F_1$  sont présentes dans tous les organismes procaryotes et eucaryotes. Elles sont composées d'un domaine membranaire  $F_0$  et d'un domaine cytosolique  $F_1$ . Le domaine  $F_1$  consiste en un hexamère constitué de trois sous-unités  $\alpha$  et de trois sous-unités  $\beta$ . Le passage d'un flux de protons permet la rotation d'une sous-unité du domaine  $F_0$ . Cette rotation conduirait à un changement de conformation du domaine  $F_1$  qui aboutirait à la synthèse d'ATP. A l'inverse, ces ATPases sont capables *in vitro* de coupler l'hydrolyse de l'ATP à un mouvement de rotation. Les sous-unités  $\beta$ , similaires à l'ATPase du SST3, sont responsables de l'activité catalytique. Les sites catalytiques se trouvent à l'interface entre deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  adjacentes (Dittrich et al. 2004).

L'ATPase des systèmes flagellaires, quant à elle, utilise l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour participer à l'export de protéines flagellaires. Elle est donc indispensable à la formation des flagelles (Macnab 2004 ; Berg 2003). Elle est activée de façon coopérative lorsqu'elle s'assemble en hexamères (Imada et al. 2007 ; Claret et al. 2003). De plus, la surexpression de cette enzyme permet l'assemblage des flagelles même en l'absence des protéines de l'anneau cytosolique (Konishi et al. 2009 ; Erhardt et al. 2010).

PscN-P. aeruginosa	-----	
YscN-Y. enterocolitica	-----	
HrcN-X. campestris	-----	
EscN-EPEC	-----MISEHDSVLE	10
InvC-Salmonella spp	-----	
Spa47-S. flexneri	-----	
PscN-P. aeruginosa	MPAPLSPLIVMRHAIEGCRPIQIRGRVTQVTGTLTKAVVPGVRIGELCQLRN--PDQSL	60
YscN-Y. enterocolitica	MLS-LDQIPHHIRHGVGSRLIQIRGRVTQVTGTLTKAVVPGVRIGELCYLRN--PDNSL	59
HrcN-X. campestris	MLAETPLLETTLERELATLAVGRRYGVVVEVVGTMKLVAGVQVSLGEVCELRQ--RDGTL	60
EscN-EPEC	KYPRIQKVLNSTVPALSLNSSTRYEGKIINIGTTIKARLPKARIGAFYKIEP-----S	70
InvC-Salmonella spp	-----MKTPRLLQYLAYPQKITGPITIEAELRDVAIGELCEITPWLAPKTG	45
Spa47-S. flexneri	-----MSYTKLLTQLSFPNRI SGPILETSLSDVSI GEICNIQAGIESNEI	45
PscN-P. aeruginosa	ALLAEVIGFQQHQALLTPLGEMLVSSNTEVSPTGGMHRVAVGEHLGQVLDGLGRPF--	117
YscN-Y. enterocolitica	SLQAEVIGFQQHQALLIPLGEMYGISSNTEVSPTGTMHQVGVGEHLGQVLDGLGRPF--	116
HrcN-X. campestris	LQRAEVVGFSRDLALLAPFGLIGLSRETRVIGLRPLAVPGVALLGRVLDGLGEPD--	117
EscN-EPEC	QRLAEVIAIDEDVEFLPFHVSVMYCGQWLSYCGDEFKIRVG DALLGR LIDIGIRPME--	123
InvC-Salmonella spp	CCTCAGGWLTAGTHRADAYRNCQGLSRDVLVYPTGRALSAAVGVSLGAVLDPTGKIVER	105
Spa47-S. flexneri	VARAQVVG F HDEK TILSLIGNSRGLSRQTLIKPTAQFLHTQVGRGLLGAVVNPLGEVTDK	105
Walker A		
PscN-P. aeruginosa	GSPPAEPAAWYP-VYRDAFPQMSRRLIERPLSLGVRAIDGLLTCGEGQRMGIFAAAGGK	176
YscN-Y. enterocolitica	GGHLPEPAAWYP-VYQDAFAPMSRKLITTPSLSLGIRVIDGLLTCGEGQRMGIFAAAGGK	175
HrcN-X. campestris	GQGAACDTWVP-IQAQAFDPMRRLIEHPMPTGVRIVDGLMTLTCGEGQRMGIFAAAGVVK	176
EscN-EPEC	SNIVAPYLPFERSLYAEPDPLLRQVIDQPFILGVRAIDGLLTCGIGQRI G I F A G S G V G K	84
InvC-Salmonella spp	FTPEVAPISEERVIDVAPPSYASRVGVREPLITGVRAIDGLLTCGEGQRMGIFASAGCGK	165
Spa47-S. flexneri	FAVTDNSEILYRPVDNAPPLYSERAAIEKPF LTGIKVIDSLLTCGEGQRMGIFASAGCGK	165
PscN-P. aeruginosa	STLLASLVRNAEVDVTVLALVGERGREVREFIESDLGEQGLRSLVSVVATSDRPFAMERAK	236
YscN-Y. enterocolitica	STLLASLIRSAEVDVTVLALIGERGREVREFIESDLGEEGLRKAVLVVATSDRPSMERAK	235
HrcN-X. campestris	STLMGMFARGTQCDVNVTVLIGERGREVREFIELILGADGLARSVVVCATSDRSIERAK	236
EscN-EPEC	STLLGMICNGASADIIIVLALIGERGREVNEFLALLP-QSTLSKCVLVVTVSDRPALERMK	143
InvC-Salmonella spp	TMLMHMLIEQTEADVFIIGLIGERGREVTEFVDMLRASHKKEKCVLFATSDFPVSVDRCN	225
Spa47-S. flexneri	TFLMNMLIEHSGADIIYVIGLIGERGREVTETVDYLNSEKSKRCVLYVATSDYSVDRCN	225
Walker B		
PscN-P. aeruginosa	AGFVATSTIAEYFRDQGRVLLMDSLTRFARAQREIGLAAGEPPTRRGYPVSFAALPRL	296
YscN-Y. enterocolitica	AGFVATSTIAEYFRDQGRVLLMDSVTRFARAQREIGLAAGEPPTRRGYPVSFAALPRL	295
HrcN-X. campestris	AAYVGTATIAEYFRDGLRVLVLLMDSVTRFARAQREIGLAAGEPPTRRGFPVSFAALPRL	296
EscN-EPEC	AAFTATTIAEYFRDQGNVLLMDSVTRYARAARDVGLASGEPPVRRGFPVSFSSLPKL	203
InvC-Salmonella spp	AAQLATTIAEYFRDQGRVLLFIDSMTRYARALRDVALASGERPARRGYPASVFDNLPR	285
Spa47-S. flexneri	AAIATATIAEYFRTEGHKVALFIDSMTRYARALRDVALAAGESPARRGYPVSFVDSLPRL	285
PscN-P. aeruginosa	MERAGQSSRG-SITALYTVLVEGDDMSEPVADETRSLDGHIVLSRKLAANHYPAIDVL	355
YscN-Y. enterocolitica	MERAGQSSKG-SITALYTVLVEGDDMTPEPVADETRSLDGHIVLSRKLAANHYPAIDVL	354
HrcN-X. campestris	LERAGMGESG-SITAFYTVLAEDDTGSDPIAEVVRGILDGHILSREIAAKNQYPAIDVL	355
EscN-EPEC	LERAGPAPKG-SITAIYTVLLESDNVNDPIGDEVRSILDGHIVLTRELAENHFPIDIG	262
InvC-Salmonella spp	LERPGGTSEG-SITAFYTVLLESEEEADPMADERSILDGHIVLSRKLAGQGHYPAIDVL	344
Spa47-S. flexneri	LERPGKLKAGGSITAFYTVLLEDDDFADPLAEVRSILDGHIVLSRNLAQKGQFPIDSL	345
PscN-P. aeruginosa	HSVSVMNQIVDDQRHAAGRLREWLAKYEEVELLLKIGEYKQGDSEADRAIEKIG-AI	414
YscN-Y. enterocolitica	RSASVMNQIVSKEHKTWAGDLRLLAKYEEVELLLKIGEYKQGDKEADQAIERMG-AI	413
HrcN-X. campestris	ASLSVMSQIVPYDHSQAAGRLRLLAKYNEVETLVQVGGEYRQGS DAVADEAIDRID-AI	414
EscN-EPEC	LSASVMHNVTSEHLRAAECKKLIATYKNVELLIRIGEYTMGQDPEADKAIKNRK-LI	321
InvC-Salmonella spp	KSVSVFGQVTTTPTHAEQAASAVRKLMTRELEQLFIDLGEYRCPAKISITIGRCRCGDSL	404
Spa47-S. flexneri	KSISVFTQVVDKHRINAAAFRELLSEIEELRTIIDFGEYKPGENASQDKIYNKIS-VV	404
PscN-P. aeruginosa	RQWLRQGTHTSDYAQAQALRSLSCT--	440
YscN-Y. enterocolitica	RGWLCQGTHELSHFNELNLETLTQ--	439
HrcN-X. campestris	RDFLSQPTDQLSAYENTLELLTSVTDDA	442
EscN-EPEC	QNFIQQSTKDISSYEKTIESLFKVVA--	347
InvC-Salmonella spp	KARLCQFVAQYSSFDDTLTSGMNAFADQN	432
Spa47-S. flexneri	ESFLKQDYRLGFTYEQTMEVIGETIR--	430

**Figure 21 : Alignement des séquences des ATPases des SST3 de différentes bactéries.**  
Alignement des séquences de PscN de *Pseudomonas aeruginosa*, YscN de *Yersinia enterocolitica*, HrcN de *Xanthomonas campestris*, EscN de *Escherichia coli enteropathogénique*, InvC de *Salmonella enterica* et Spa47 de *Shigella flexneri*. Sont indiqués en rouge les acides aminés entièrement conservés, en vert les acides aminés conservés fortement et en bleu plus faiblement. Les sites Walker A puis Walker B sont surlignés en jaune. L'arginine surlignée en vert, très conservée parmi les différentes ATPases, serait imbriquée dans le site catalytique adjacent. Enfin, le domaine C-terminal des ATPases serait impliqué dans l'interaction avec des partenaires spécifiques : l'acide aminé surligné en bleu serait par exemple responsable de l'interaction de l'ATPase EscN avec un complexe chaperonne-effecteur, comme expliqué dans le paragraphe suivant (2).

## 2) Structure et activité enzymatique

Les ATPases du SST3 de certaines espèces bactériennes ont pu être caractérisées, comme YscN chez *Yersinia spp.*, Spa47 chez *Shigella*, HrcN chez *Pseudomonas syringae* ou *Xanthomonas campestris* (Zarivach et al. 2007 ; Akeda et al. 2004 ; Blaylock et al. 2006 ; Johnson et al. 2008 ; Schroeder et al. 1998 ; Lorenz et al. 2009). Toutes ces enzymes ont des caractéristiques communes, tant au niveau de la structure que de l'activité.

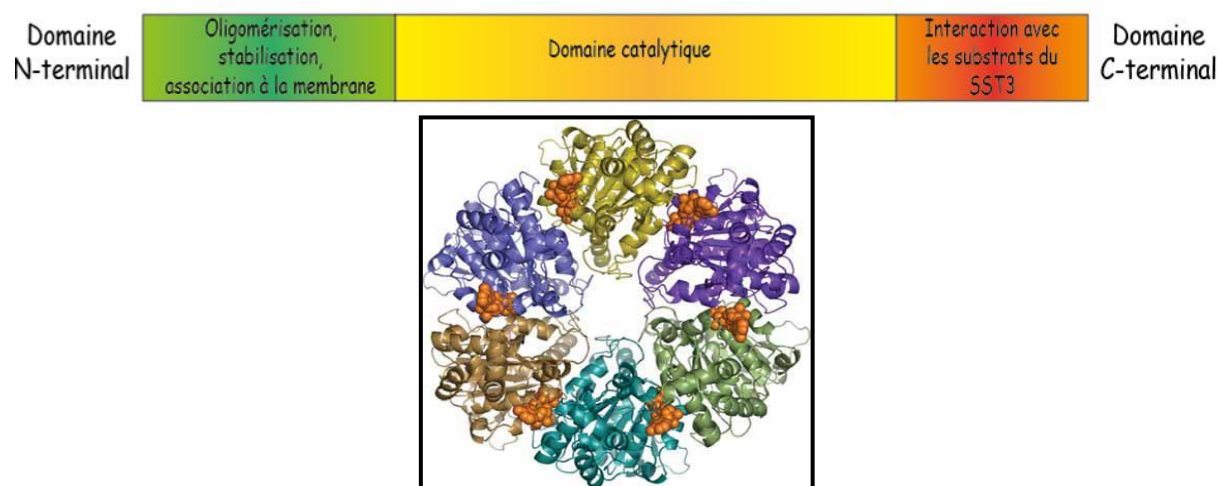
Elles s'assemblent en hexamères ou bien en dodécamères formés par deux hexamères empilés (Moraes et al. 2008 ; Akeda et al. 2005 ; Pozidis et al. 2003 ; Muller et al. 2006). Les dimensions des anneaux hexamériques formés sont également similaires, avec une hauteur de 7 nm, un diamètre externe d'environ 11 nm, et un diamètre interne variant entre 2 et 3 nm à l'extrémité de l'anneau et entre 3,8 et 5 nm au milieu de l'anneau (Muller et al. 2006) ; (Zarivach et al. 2007).

Le domaine central, contenant les sites Walker A et WalkerB (acides aminés 161 à 179 et 244 à 260 de PscN, Figure 21), est responsable de l'activité catalytique. Il est situé à l'interface entre deux sous-unités adjacentes (Zarivach et al. 2007).

Leur domaine N terminal pourrait être impliqué dans leur oligomérisation et leur stabilisation, ainsi que dans leur localisation à la membrane, comme cela a été suggéré pour l'ATPase EscN de EPEC et pour l'ATPase flagellaire FliI (Zarivach et al. 2007 ; Okabe et al. 2009). Cependant, l'implication de ce domaine dans l'association à la membrane est très controversée puisque l'ATPase SsaN du SST3 de l'îlot de pathogénicité SPI-2 de *Salmonella enterica* est localisée au niveau de la membrane indépendamment de son domaine N-terminal (Cooper 2011). L'ATPase du SST3 est capable de s'assembler correctement même en l'absence d'activité catalytique. Concernant sa localisation, des expériences de compartimentation cellulaire montrent que l'ATPase est principalement retrouvée dans la fraction contenant la membrane interne, bien qu'elle soit prédite comme une protéine cytoplasmique (Pozidis et al. 2003). En effet, l'ATPase interagit *in vivo* avec des protéines du SST3 liées fortement à la membrane interne. Ces interactants, conservés parmi les différentes espèces bactériennes, sont les homologues aux protéines PscL, PscK et PscQ chez *P. aeruginosa* (Blaylock et al. 2006 ; Stone et al. 2008 ; Johnson et al. 2008). Ils sont également homologues à des sous-unités des F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPases et à des protéines du système flagellaire.

Enfin, le domaine C terminal des ATPases du SST3 est moins conservé et serait impliqué dans des interactions plus spécifiques avec des substrats du SST3 (Zarivach et al. 2007 ; Akeda et al. 2004 ; Muller et al. 2006) Par exemple, une modélisation du complexe formé entre EscN du SST3 de EPEC et une chaperonne a indiqué l'importance de l'acide

aminé V393 du domaine C-terminal de l'ATPase EscN pour leur interaction. La mutation de cet acide aminé V393P conduit à une absence de sécrétion des effecteurs (Zarivach et al. 2007).



**Figure 22 : Caractéristiques des ATPases des SST3**

*a) Les domaines de l'ATPase*

*b) Modèle de l'hexamère de l'ATPase de E. coli EscN, avec l'ATP représenté en orange à l'interface entre chaque sous-unité (Zarivach et al. 2007)*

L'activité enzymatique des ATPases du SST3 caractérisées jusqu'à présent suivrait une cinétique de Michaelis-Menten, c'est-à-dire qu'elle serait directement liée à la concentration en substrat. Elle est de l'ordre de 0,55  $\mu\text{mol}$  de phosphate libéré par minute. Ces ATPases sont activées de façon coopérative par homo-oligomérisation (Pozidis et al. 2003 ; Stone et al. 2008). La protéine homologue à PscL, qui interagit avec l'ATPase, est capable d'inhiber son activité. Il est intéressant de noter que la protéine PscL est homologue à FliH dans le système flagellaire et aux sous-unités b et  $\delta$  des F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPases. Toutes ces molécules ont des rôles d'inhibition de l'ATPase (Minamino et al. 2000 ; Pallen et al. 2006).

La présence de trop fortes concentrations en ATP, supérieures à 20mM, semble également inhiber l'activité enzymatique (Lorenz et al. 2009). A l'inverse, par homologie avec les ATPases flagellaires, les phospholipides conduiraient à une suractivation de cette enzyme (Claret et al. 2003).

## **B. L'ATPase est nécessaire à l'activité du SST3**

La forte conservation de séquence, de structure, et d'activité des ATPases du SST3 parmi différents microorganismes suggère que cette enzyme joue un rôle important dans le système. Effectivement, l'ATPase est nécessaire à son fonctionnement. Les souches



bactériennes délétées du gène codant pour cette protéine ne sont pas cytotoxiques envers les cellules eucaryotes et ne sont pas capables de sécréter les substrats du SST3 (Eichelberg et al. 1994 ; Andrade et al. 2007 ; Johnson et al. 2008 ; Lorenz et al. 2009). Il a été montré chez *Shigella flexneri* qu'en l'absence d'ATPase, seuls les composants de la membrane interne et du cytoplasme sont assemblés (Johnson et al. 2008). Cependant, dans le cas des systèmes flagellaires, présentant de fortes homologues avec les SST3, l'assemblage des flagelles pourrait avoir lieu y compris en l'absence d'ATPase (Chen et al. 2011).

De plus, l'activité catalytique de l'ATPase est indispensable à l'activité du SST3. Effectivement, lorsque l'ATPase du SST3 est correctement assemblée mais est incapable d'hydrolyser l'ATP, le système ne peut pas fonctionner (Lorenz et al. 2009). Ainsi, lorsque les ATPases ne possèdent pas d'activité enzymatique suite à des mutations dans leur site catalytique, les bactéries présentent le même phénotype qu'en l'absence d'ATPase.

Enfin, l'assemblage d'une sous-unité d'ATPase inactive avec des sous-unités natives conduit chez *Xanthomonas campestris* à des enzymes oligomériques inactives (Lorenz et al. 2009). La suractivation de l'inhibiteur de l'ATPase PscL a pour conséquence de bloquer toute l'activité du SST3 (Blaylock et al. 2006).

### C. Rôle potentiel de l'ATPase

L'ATPase du SST3, par ses similitudes avec d'autres enzymes de la famille AAA+ et son activité indispensable au bon fonctionnement du système, pourrait être impliquée dans la prise en charge des substrats de sécrétion et/ou la sécrétion en tant que telle.

#### 1) Dissociation des complexes chaperonnes-substrats de sécrétion

La plupart des substrats à sécréter par le SST3 sont liés à une chaperonne dans le cytoplasme bactérien. Ils sont ensuite sécrétés seuls à travers l'aiguille de sécrétion. La séparation de ces complexes stables chaperonne-substrat avant la sécrétion nécessite donc un apport d'énergie, et pourrait être réalisée par l'ATPase.

L'analyse *in vitro* mais aussi *in vivo* des interactants de l'ATPase conforte cette hypothèse, puisque des associations ont été démontrées entre l'ATPase et la chaperonne et/ou l'effecteur correspondant. Par exemple, chez *EPEC*, l'ATPase EscN est capable d'interagir avec l'effecteur Tir mais aussi avec sa chaperonne CesT (Gauthier et al. 2003). L'ATPase du SST3 de *Salmonella enterica* interagit avec le complexe chaperone effecteur SicP-SptP via la chaperonne (Akedo et al. 2005), mais également avec l'effecteur SopD (Boonyom et al.



2010). Quant à l'ATPase YscN de *Yersinia*, elle peut interagir avec le substrat de sécrétion précoce YopR (Sorg et al. 2006). Enfin, l'ATPase HrcN du SST3 de *Xanthomonas campestris* peut se lier à la chaperonne globale HpaB (Lorenz et al. 2009).

De plus, d'après des expériences réalisées *in vitro*, l'ATPase est capable de dissocier ces complexes de manière ATP dépendante (Akeda et al. 2005 ; Lorenz et al. 2009). Cependant, les études sont spécifiques à chaque microorganisme, puisque différentes interactions protéiques ont été identifiées avec des couples spécifiques de chaperonnes-effecteurs.

Enfin, le rôle de l'ATPase sur l'ensemble des substrats du SST3, comme par exemple les protéines du translocon ou l'aiguille, n'a pas été démontré.

## 2) Dépliage des substrats de sécrétion

L'ATPase pourrait également permettre de déplier entièrement ou partiellement les substrats au moment de leur sécrétion. En effet, ils sont supposés être transportés hors de la bactérie jusqu'à la cellule hôte en passant dans l'aiguille du SST3. Or cette aiguille a un diamètre interne trop étroit, d'environ 1,5 nm, pour permettre le passage des protéines repliées (Fujii et al. 2012 ; Cordes et al. 2003 ; Deane et al. 2006). Il a d'ailleurs été montré que des gros substrats, comme la glutathion-S-transférase (GST), la dihydrofolate réductase (DHFR), la  $\beta$ -galactosidase ou encore l'ubiquitine, connus pour être stables et compacts, ne peuvent être exportés par le SST3 (Riordan et al. 2008 ; Akeda et al. 2005 ; Lee et al. 2002 ; Sorg et al. 2005). Ces substrats sont donc dits « impassables ».

L'activité potentielle de l'ATPase dans le dépliement des substrats de sécrétion est également en accord avec le fait que des substrats de sécrétion interagissent avec cette enzyme, comme par exemple chez *EPEC*, *S. enterica*, *Yersinia* ou *X. campestris* (Gauthier et al. 2003 ; Akeda et al. 2005 ; Boonyom et al. 2010 ; Lorenz et al. 2009 ; Sorg et al. 2006).

De plus, chez *Yersinia enterocolitica*, des expériences réalisées avec un substrat précoce de sécrétion YopR fusionné à un substrat « impassable », et donc difficile à déplier, sont cohérentes par rapport à ce rôle hypothétique de l'ATPase. Elles montrent que ce substrat de sécrétion chimérique ne peut pas être sécrété par le SST3 de *Yersinia enterocolitica* mais interagit avec l'ATPase du SST3, ce qui suggère que l'ATPase n'arrive pas à prendre en charge ce substrat, qui reste bloqué avec l'ATPase (Sorg et al. 2006).

Enfin, l'étude de (Akedo et al. 2005) a montré *in vitro* que l'ATPase de *S. enterica* est capable de déplier l'effecteur SptP de manière ATP dépendante, par des tests de sensibilité aux protéases et d'activité de l'effecteur.

### 3) Apport d'énergie pour la sécrétion des substrats

L'ATPase du SST3 pourrait également être impliquée dans l'export des substrats en tant que tel. En effet, l'activité ATPase est indispensable à la sécrétion des protéines du système et pourrait apporter l'énergie nécessaire à leur transport (Ritchie et al. 2005 ; Woestyn et al. 1994).

Cependant, certaines études réalisées sur les SST3 pathogéniques ou flagellaires ont montré que la sécrétion était abolie en présence du protonophore CCCP (Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) qui permet d'équilibrer la concentration en protons  $H^+$  dans la bactérie et à l'extérieur (Lorenz et al. 2009 ; Paul et al. 2008 ; Wilharm et al. 2007 ; Galan 2008). Cela suggère que la force protomotrice serait aussi impliquée dans l'export des protéines du SST3.

Néanmoins, l'implication du potentiel électrique ou du gradient de protons est très incertaine puisque les observations sont différentes chez le système flagellaire de *Salmonella* et chez le SST3 de *Yersinia* (Paul et al. 2008 ; Wilharm et al. 2007 ; Galan 2008 ; Minamino et al. 2008 ; Minamino et al. 2008).

## D. Applications

Du fait de son caractère indispensable à l'activité du SST3, l'ATPase pourrait être une cible thérapeutique intéressante pour le développement de nouveaux médicaments de lutte contre *P. aeruginosa*. Une meilleure compréhension de l'activité de cette enzyme pourrait en effet suggérer de nouvelles stratégies pour bloquer l'important facteur de virulence qu'est le SST3.

Par exemple, chez *Yersinia*, un criblage d'une chimiothèque a d'ailleurs permis d'identifier des molécules capables d'inhiber l'activité du domaine catalytique purifié ou de limiter la sécrétion de l'effecteur YopE par les bactéries (Swietnicki et al. 2011). De plus, ces molécules ne sont pas ou très peu cytotoxiques pour les cellules eucaryotes, probablement parce qu'elles ciblent spécifiquement l'enzyme bactérienne. En effet, les ATPases

bactériennes et humaines présentent moins de 25% d'identité et ont des différences marquées au niveau des sites catalytiques (Swietnicki et al. 2011).

L'utilisation de ces molécules est donc envisageable pour bloquer l'activité de l'ATPase du SST3 et donc de tout le système, bien que des études complémentaires soient nécessaires.

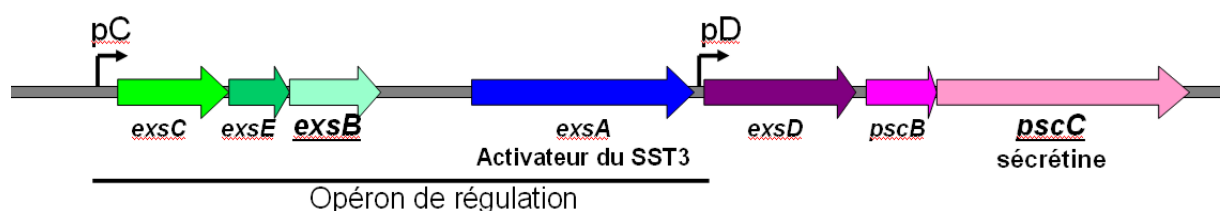
Une autre stratégie de lutte contre les bactéries pathogènes possédant un SST3 serait d'utiliser des souches atténuées pour la vaccination. Une récente étude a ainsi montré que la vaccination de souris par des souches bactériennes de *Yersinia pestis* délétées de l'ATPase du SST3 permet de protéger ces animaux contre la peste bubonique. Ces bactéries jouent en effet un rôle de vaccin atténué et déclenchent la production d'anticorps dirigés contre une protéine de la capsule (F1) (Bozue et al. 2012).

## V. La protéine ExsB et le SST3

Le gène *exsB* de *P. aeruginosa* est localisé dans l'ensemble de gènes codant pour des composants du SST3, suggérant son rôle dans ce système.

### A. Localisation génétique de *exsB*

Le gène *exsB* a été caractérisé dans plusieurs études. Une ambiguïté sur le codon « start » de ce gène avait été observée, puisque sa séquence codante pourrait débuter 12 nucléotides avant le site annoté à l'origine (Frank et al. 1991).



**Figure 23 : Localisation génétique de *exsB* dans l'opéron de régulation du SST3 de *P. aeruginosa*, sous le contrôle du promoteur pC.**

Le gène *exsB* est situé dans l'opéron de régulation du SST3, en amont du gène *exsA* (Figure 23). Ce dernier code pour le principal activateur transcriptionnel du SST3.

Cela suggère que la protéine codée par *exsB*, notée ExsB, pourrait participer à la régulation du système. Elle pourrait en effet être un acteur de la cascade d'activation du SST3, par exemple en interagissant avec l'une des protéines de cette voie ExsC, ExsE, ExsA ou ExsD. Pour appuyer cette hypothèse, une diminution de la production de l'effecteur ExoS a été observée lors de la délétion de *exsB* (Goranson et al. 1997).

## B. Homologies de ExsB avec des protéines de la famille des pilotines

La protéine ExsB est prédite pour être une petite protéine de 141 acides aminés, avec un poids moléculaire de 15,6 kDa et un point isoélectrique élevé de 9,43. Son expression n'a jamais été vérifiée chez *P. aeruginosa* car des essais de détection indirecte avaient échoué (Goranson et al. 1997).

ExsB est homologue à des protéines appartenant à des systèmes de sécrétion de type III de diverses bactéries, comme représenté sur l'alignement de séquences ci-dessous. Ces protéines appartiennent toutes à la famille des pilotines, ce qui suggère que la protéine ExsB pourrait elle aussi être une pilotine. Par contre, un alignement de ExsB avec d'autres pilotines de SST3 bactériens montre que les séquences sont peu conservées. Ces résultats suggèrent que différentes familles de pilotines pourraient exister.

### a)

ExsB_P_aeruginosa	MRCWMLPLALLLGGCVSQPAPMSPKVTVGGSVGGVSLQARQAQLRLRLYAVVQGRMQTI
LscW_P_luminescens	MTKIGLVLLCLLITGCVSEVVKHDASRLIEGDTVMPVSLPKTADVEVSLTVVEGKVLTV
YscW_Y_pestis	MSRIIALIISFLLVGCATPPMP---AQRIVGEVRMSRPLSRIAHIDVSMFGLYEGKVREV
ExsB_A_salmonicida	MRGLLALMLSAMLAGCVTPPELKPSQQQLKGEVHFPPQALPRSATVEVAVLSVIGGRPLQV

ExsB_P_aeruginosa	AERRYVSGPLRLRYAFDLEVDRLGEALYLRTELSSWVGVAAVQASAWQ---QVAAGVDER
LscW_P_Luminescens	GEMYRLDMLPLTFSMRLSPQFSHG-ELFLKARLRWDGKRAIQAKSQQ---RVVAGKRRII
YscW_Y_pestis	QRTHFETGNLPLFFSIKLNPAQRGEGELYLRSTLSFP-ERGVQAVAQQ---KLTGKNKVV
ExsB_A_Salmonicida	AATRYEVTMLPLFLDLRLTPLQLAEGEITYLRARLRFMDGTAVQAMSQQKVFKIFNDKKMV

ExsB_P_aeruginosa	VRLVRRDFFPNATAARPEERSGND
LscW_P_Luminescens	VQLSPLPCYPEL-----
YscW_Y_pestis	LQMIPKTCYPNQLPNTR-----
ExsB_A_Salmonicida	IQLPKADYPOQ-----

### b)

ExsB_P_aeruginosa	MRCWMLPLALLLGGCVSQPAP-----MSPKVTVGGSVGGVSLQARQAQ
YscW_Y_pestis	MSRIIALIISFLLVGCATPPMP-----AQR---IVGEVRMSRPLSRIAH
InvH_S_typhimurium	MKKFYSLCPVFLIIGCAQVPLPSSVSKPVQQPGAQKEQLANANSIDECQS
MxiM_S_flexneri	MIRHGSNKLKIFILSILLTSL-----GCALKSSNSSEKEWHIVPVSKD

ExsB_P_aeruginosa	LRLRLYAVVQGRMQTIAERRYVSGPLRLRYAFDLEVDRLGEALYLRTEL
YscW_Y_pestis	IDVSMFGLYEGKVREVQRTHFETGNLPLFFSIKLNPAQRGEGELYLRSTL
InvH_S_typhimurium	LPYVPSDLAKNKSLSNHNADNSASKNSAIISSIFCEKYKQTKEQALTFFQ
MxiM_S_flexneri	YFSIPNDLLWSEFNTTNKSINVYSKCI SGKAVYSFNAGKFMGNFNVKEVDG

ExsB_P_aeruginosa	SWVGVAAVQASAWQQVAAGVDERVRLVRDCFPNCTAARPEERSGND-
YscW_Y_pestis	SFP-ERGVQAVQKLTGKNKVVLQMIPKTCYPNCQLPNTR-----
InvH_S_typhimurium	EHPQYMRSEDEEQLMTEFKKVLLEPGSKNLSIYQTLAAHERLQAL-
MxiM_S_flexneri	CFMDAQKIAIDKLFSLKDGVLKGNKINDTILIEKDGEVRLKLIRGI

**Figure 24 : Alignements de séquences d'acides aminés de ExsB**

*a) Alignement de séquences protéiques de ExsB de P. aeruginosa et ses homologues dans les SST3 de Y. pestis (YscW), P. luminescens (symbiote de nématode capable d'infecter les insectes, LscW) et de A. salmonicida (pathogène de poissons, ExsB), Izoré et al., 2011. Les lipobox sont surlignées en jaune. Les résidus entièrement conservés sont notés en rouge, fortement conservés en vert et faiblement en bleu. Deux cystéines, surlignées en vert à la fin des séquences, sont très conservées mais leur rôle n'est pas connu.*

*b) Alignement de séquences de ExsB de P. aeruginosa avec des pilotines de SST3 étudiées chez des pathogènes bactériens : YscW de Y. pestis, InvH de S. typhimurium et MxiM de S. flexneri. Les lipobox sont surlignées en jaune. Les résidus entièrement conservés sont notés en rouge, fortement conservés en vert et faiblement en bleu.*

Toutes ces protéines possèdent une « lipobox », c'est-à-dire une séquence consensus permettant l'ancrage à des lipides, et donc l'attachement à la membrane bactérienne.

La protéine ExsB présente 60% de similarités de séquence avec la pilotine YscW chez *Yersinia spp.*

Il est également intéressant de noter que les environnements génétiques de *exsB* et *yscW* sont très proches, puisque le gène situé en aval est celui codant pour l'activateur transcriptionnel du SST3. La similarité entre les activateurs transcriptionnels de *P. aeruginosa* et de *Yersinia spp.* est d'ailleurs très importante (56% d'identité) (Frank et al. 1991).

Les pilotines ont des structures très variées mais possèdent des caractéristiques communes.

Ce sont toujours des lipoprotéines de faible poids moléculaire et de point isoélectrique élevé (Remans et al. 2010).

Elles ont un rôle dans l'assemblage de la sécrétine des systèmes de sécrétion dans la membrane externe bactérienne (Koo et al. 2012).

### C. Activité des pilotines

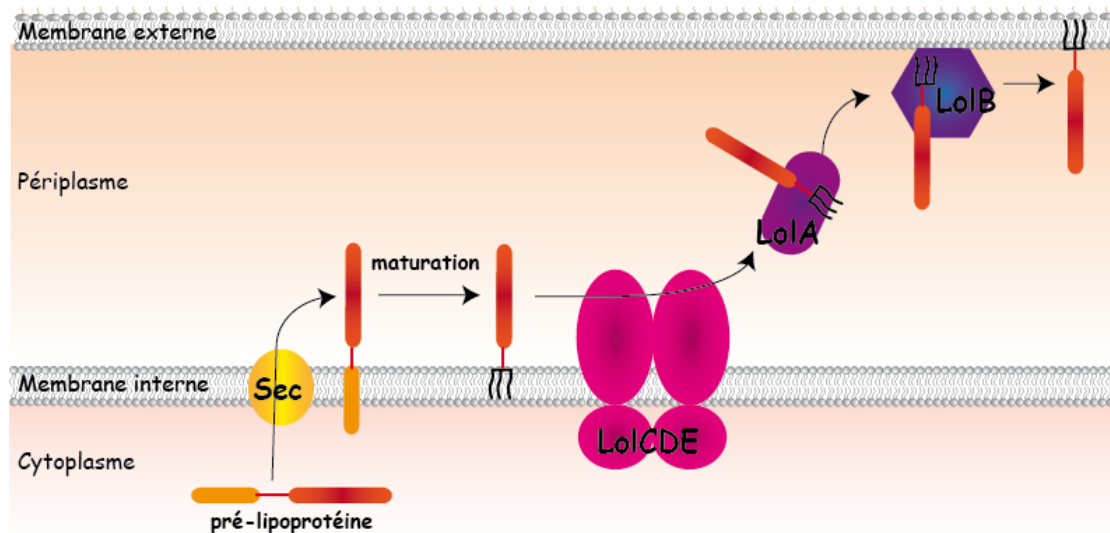
Les pilotines sont très souvent nécessaires à la localisation, l'oligomérisation, et/ou la stabilisation des sécrétines dans la membrane externe.

### 1) L'insertion des protéines bactériennes dans la membrane externe

Deux machineries permettent l'insertion des protéines dans la membrane externe.

La première est la **machinerie Lol**, très étudiée chez *E. coli*. Son rôle est de prendre en charge les lipoprotéines pour les acheminer de la membrane interne vers la membrane externe.

Les principales étapes sont résumées sur la figure suivante.



**Figure 25 : Mode d'action de la machinerie Lol pour l'insertion des lipoprotéines dans la membrane externe.**

*Lipobox : séquence représentée par un trait rouge, site de lipidation (Source : (Narita 2011))*

Après leur transport par la voie Sec, les prélipoprotéines sont attachées à la membrane interne. Elles subissent alors plusieurs modifications enzymatiques pour leur maturation.

Les lipoprotéines sont ensuite reconnues par un ABC (ATP Binding Cassette) transporteur constitué par le complexe protéique LolCDE. Cet ABC transporteur permet de décrocher les lipoprotéines de la membrane interne (Yakushi et al. 2000). Simultanément, les lipoprotéines libérées se lient à la cavité hydrophobe de la protéine périplasmique LolA (Oguchi et al. 2008).

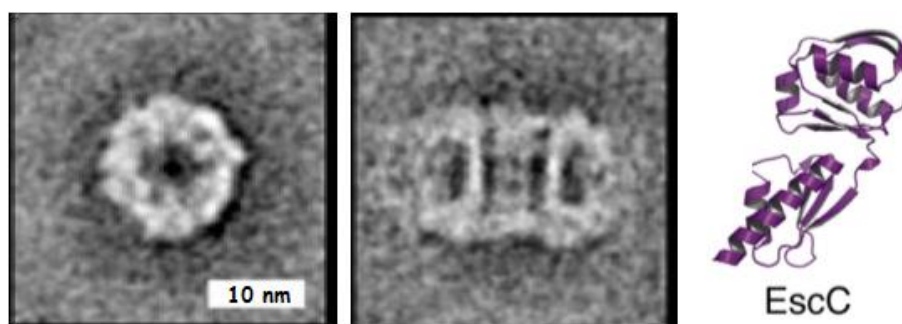
Le complexe soluble ainsi formé traverse le périplasme jusqu'à la membrane externe. Les lipoprotéines sont alors incorporées dans la membrane par la protéine LolB, elle aussi attachée à la membrane externe (Tsukahara et al. 2009).

Une autre voie, la **voie Bam**, permet aux protéines non lipidées, en tonneau  $\beta$ , d'être insérées dans la membrane externe des bactéries.

Après leur passage à travers la membrane interne par la voie Sec et le clivage de leur séquence signal N terminale, les protéines dépliées sont libérées dans le périplasme. Elles sont ensuite transportées dépliées par des chaperonnes jusqu'à la membrane externe. Enfin, elles sont repliées correctement et assemblées dans la membrane externe grâce au complexe Bam, constitué par la protéine membranaire BamA (= YaeT) et les lipoprotéines BamB-E (Knowles et al. 2009).

## 2) L'assemblage des sécrétines

Les sécrétines sont les composants clés de la membrane externe de nombreux systèmes de sécrétion, comme le SST2, le SST3 ou les pili de type IV. Elles ont des caractéristiques communes, puisqu'elles s'assemblent en anneaux oligomériques de 12 à 14 sous-unités, de poids moléculaire très élevé et résistants à la chaleur et au SDS (Sanowar et al. 2010 ; Burghout et al. 2004 ; Spreter et al. 2009). La sécrétine du SST3 de *Yersinia spp.* qui présente 78% de similarité avec la sécrétine de *P. aeruginosa*, a été caractérisée. D'un poids moléculaire proche de 1000 kDa, les anneaux ont pu être visualisés par microscopie électronique (Koster et al. 1997 ; Burghout et al. 2004). De même, les observations par microscopie électronique des sécrétines de *S. typhimurium* et de *S. flexneri*, ainsi que la résolution de la structure du domaine N-terminal de la sécrétine d'*EPEC* ont permis de mieux comprendre l'assemblage des sécrétines.



**Figure 26 : Caractéristiques des sécrétines**

*a) Cliché de microscopie électronique par coloration négative de la sécrétine de Yersinia (Source : (Burghout et al. 2004)*

*b) Structure du domaine Nterminal périplasmique de la sécrétine de E. coli (Source : (Spreter et al. 2009) )*

Leur domaine C-terminal serait imbriqué dans la membrane externe tandis que leur domaine N-terminal formerait une chambre périplasmique permettant l'interaction avec des protéines de la membrane interne (Korotkov et al. 2011). Par exemple, la sécrétine du SST3

de *S. typhimurium* interagit avec l'homologue à PscD dans la membrane interne (Sanowar et al. 2010). Les sécrétines subiraient des changements conformationnels lors de l'interaction avec leurs partenaires, pour permettre le passage des substrats (Korotkov et al. 2011).

Malgré ces structures conservées, les différentes sécrétines n'ont pas les mêmes mécanismes d'assemblage (Koo et al. 2012). Certaines sécrétines ne nécessitent aucune aide pour leur localisation et leur oligomérisation. Par exemple, la sécrétine HxcQ du Système de Sécrétion de Type II de *P. aeruginosa* est lipidée à son extrémité N terminale et est capable de s'auto-assembler correctement dans la membrane externe (Viarre et al. 2009). La plupart des sécrétines au contraire nécessitent des pilotines pour leur oligomérisation et/ou leur localisation et/ou leur stabilisation.

### 3) Rôle des pilotines

Du fait des différentes propriétés d'assemblage des sécrétines, le mode d'action des pilotines est très variable d'une espèce bactérienne à l'autre mais aussi d'un système de sécrétion à l'autre. Le tableau suivant illustre la diversité des activités des pilotines sur leurs sécrétines.

Système / Bactérie	Sécrétine	Pilotine	domaine d'interaction au niveau de la sécrétine	Effet de l'absence de pilotine sur la sécrétine		Références
				Oligomérisation	Localisation	
SST2 / <i>Dickeya dadanti</i>	OutD	OutS	C-terminal	moins d'oligomères	membrane interne	Shevchick et al. (1997, 1998) ; Condemine et al. (2000) ; S. Gu et al. (2012)
SST2 / <i>Klebsiella oxytoca</i>	PulD	PulS	C-terminal	oligomérisation correcte	membrane interne	Nouwen et al. (1999)
Pili de type IV / <i>Neisseria meningitidis</i>	PilQ	PilW	?	monomères	membrane externe	Carbonnelle et al (2005) ; Szeto et al (2011)
Pili de type IV / <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PilQ	PilF	?	monomères	membrane interne	Koo et al (2011)
SST3 / <i>Shigella flexneri</i>	MxiD	MxiM	C-terminal	Dégradation de la sécrétine		R. Schuch et al. (2001) ; M. Okon et al. (2008) ; J. Derrick (2008)
SST3 / <i>Salmonella typhimurium</i>	InvG	InvH	C-terminal	Moins d'oligomères ? Oligomérisation correcte ?	membrane interne	A. M. Crago et V. Koronakis (1998)
SST3 / <i>Yersinia enterocolitica</i>	YscC	YscW	pas C-terminal	moins d'oligomères	membrane interne	P. Burghout et al. (2004)

**Tableau 3 : Activité des pilotines de différents systèmes de sécrétion**  
**Tableau adapté de (Koo et al. 2012)**

Certains couples de pilotines-sécrétines ont été très étudiés. Ce paragraphe présente de façon plus détaillée le rôle des pilotines sur les sécrétines et l'interaction entre ces protéines.



Dans le **SST2** de *K. oxytoca*, un pathogène opportuniste, la pilotine PulS se lie au domaine C-terminal de la sécrétine PulD, avec un ratio molaire 1 :1. Son rôle est de protéger la sécrétine de la dégradation, d'empêcher son oligomérisation prématurée et de la conduire à travers le périplasme jusqu'à la membrane externe (Guilvout et al. 2006). Par contre, elle n'est pas impliquée dans son oligomérisation (Hardie et al. 1996). Le domaine C-terminal de la sécrétine PulD rend l'assemblage de cette protéine dépendant de la pilotine PulS, puisqu'en son absence, PulD est correctement assemblé dans la membrane externe (Daefler et al. 1997). Lorsque la pilotine est modifiée pour rester dans le périplasme sans s'insérer dans la membrane externe, la sécrétine PulD est toujours protégée mais mal localisée. Les fonctions de la pilotine, protection et localisation dans la membrane externe, sont donc dissociables (Hardie et al. 1996). Récemment, il a été montré qu'une acylation lipidique du domaine N terminal de la sécrétine permettait d'accomplir le même rôle que la pilotine, suggérant l'implication de la voie Lol dans la prise en charge de la pilotine et la sécrétine jusqu'à la membrane externe. Cette hypothèse a été confirmée car le blocage du complexe pilotine-LolA conduit à une mauvaise localisation de la sécrétine (Collin et al. 2011).

Dans le SST2 de *D. dadanti*, un phytopathogène, la pilotine OutS interagit également avec le domaine C-terminal de la sécrétine OutD afin de participer à sa localisation et à sa stabilisation. La lipidation de la pilotine est indispensable pour conduire la sécrétine à la membrane externe (Shevchik et al. 1997 ; Shevchik et al. 1998). Par contre, contrairement au couple pilotine-sécrétine du SST2 de *K. oxytoca*, le domaine C terminal de la sécrétine OutD est important à la fois pour sa localisation et pour sa stabilisation par OutS (Gu et al. 2012).

La pilotine PilW du **pili de type IV** de *Neisseria spp.* participe à la stabilisation des oligomères de sécrétine PilQ mais pas à leur localisation dans la membrane externe (Jain et al. 2011 ; Carbone et al. 2005).

Concernant les pilotines du **SST3**, elles ont été caractérisées chez *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* et *Yersinia enterocolitica* et ont toutes des spécificités.

Chez *Shigella flexneri*, la pilotine MxiM permet d'améliorer l'oligomérisation et de contrôler la stabilité de la sécrétine MxiD (Schuch et al. 2001). D'un point de vue structurel, elle possède une cavité permettant la liaison avec la sécrétine, ainsi qu'une queue lipidique permettant l'attachement à la membrane externe (Okon et al. 2008). L'interaction entre la pilotine et la sécrétine se fait par le domaine C terminal de la sécrétine (Lario et al. 2005). Un modèle a été proposé pour expliquer le mode d'action de cette pilotine. La protéine MxiM,

liée à la sécrétine MxiD, serait prise en charge par la protéine LolA jusqu'à la membrane externe. Un gros complexe se formerait donc entre LolA, MxiM et MxiD. Finalement, MxiM permettrait de piloter la sécrétine MxiD au niveau de la membrane externe (Derrick 2008). Cependant, le fait que MxiM soit une pilotine est controversé car une lipoprotéine de la membrane interne, MxiJ, a un rôle tout à fait similaire à MxiM envers la sécrétine MxiD (Schuch et al. 2001).

Chez *Salmonella typhimurium*, contrairement aux observations faites chez *Shigella flexneri*, une mauvaise localisation de la sécrétine est observée en l'absence de la pilotine (Crago et al. 1998). L'effet de la pilotine sur la stabilité de la sécrétine est controversé. Le domaine C terminal de la sécrétine rend cette protéine dépendante de sa pilotine pour l'assemblage dans la membrane externe, comme chez *K. oxytoca* (Daepler et al. 1998).

Enfin, chez *Yersinia enterocolitica*, des études ont été menées dans des souches n'exprimant aucune protéine du SST3 autre que la pilotine YscW et la sécrétine YscC. L'absence de la protéine YscW conduit à une diminution de la quantité d'oligomères de sécrétine, avec en parallèle une augmentation de la quantité de monomères. De plus, elle entraîne une mauvaise localisation puisque YscC se trouve majoritairement dans la membrane interne au lieu de la membrane externe. La pilotine YscW est donc directement impliquée dans l'oligomérisation et la localisation de la sécrétine YscC.

La caractérisation de cette protéine YscW est particulièrement intéressante puisqu'elle présente de fortes homologies avec la protéine ExsB de *P. aeruginosa*.

Contrairement aux autres complexes pilotine-sécrétine, la pilotine YscW est capable d'affecter la sécrétine YscC même en l'absence du domaine C-terminal. Ce domaine C terminal est également responsable de la dépendance envers la pilotine YscW pour la localisation, tout comme chez *Salmonella typhimurium* (Burghout et al. 2004 ; Diepold et al. 2010).

Enfin, la lipidation de YscW est indispensable à son activité de pilotine (Burghout et al. 2004). Cela conforte le modèle proposé chez *S. flexneri*, dans lequel la pilotine serait prise en charge jusqu'à la membrane externe grâce à sa queue lipidique (Derrick 2008).

L'interaction entre YscC et YscW n'a pas été montrée, mais les études ont prouvé que la pilotine a un effet direct sur la sécrétine. La pilotine YscW n'est pas co-purifiée avec la sécrétine, contrairement à la pilotine de *K. oxytoca* (Burghout et al. 2004). Ces résultats suggèrent que l'interaction entre les deux protéines serait transitoire, et durerait seulement pendant le transport de la sécrétine à travers le périplasme.

Toutes ces études montrent que malgré une grande diversité d'actions, la pilotine a toujours un effet sur la localisation et/ou l'oligomérisation de la sécrétine, voire sur sa stabilisation. L'ancrage de la pilotine à la membrane externe est également important pour son activité.

#### 4) *Les pilotines des SST3 dans la virulence bactérienne*

Les pilotines, par leur rôle dans l'assemblage d'un composant clé du SST3, sont impliquées dans l'activité de ce système et par conséquent dans la virulence bactérienne. Chez *Salmonella typhimurium* par exemple, la délétion du gène codant pour la pilotine InvH, ou bien la présence de mutations, conduit à une diminution de l'invasivité des souches à la fois *in vitro* et *in vivo* (Lodge et al. 1995 ; Watson et al. 1995) ainsi qu'à une diminution de la sécrétion des effecteurs (Pati et al. 2013). De même, chez *Yersinia spp.*, une diminution de la sécrétion de la plupart des protéines du SST3, notamment les protéines du translocon et des effecteurs, est observée *in vitro* (Allaoui et al. 1995), avec parfois une accumulation intracellulaire de ces protéines. En conséquence, les bactéries ne possédant pas la pilotine induisent une plus faible apoptose des cellules infectées (Bi et al. 2009).

#### **D. Rôle potentiel de ExsB dans le SST3 de *Pseudomonas aeruginosa***

Peu d'informations sont disponibles sur la protéine ExsB. Son expression dans *P. aeruginosa* est incertaine, car une tentative de détection de la protéine ExsB chez ce microorganisme avait échoué (Goranson et al. 1997). Cependant, cet essai reposait sur la détection indirecte de la protéine puisqu'il consistait en la détection de l'activité enzymatique CAT (Chloramphenicol acetyl transferase) de la protéine ExsB fusionnée avec le domaine CAT. De plus, la séquence d'acides aminés d'ExsB posséderait des homologies avec des protéines de bactéries gram négatives, ce qui renforce l'hypothèse que la protéine ExsB pourrait être produite par *P. aeruginosa*. La structure de la protéine ExsB est également inconnue. Par contre, il a été montré que le fait de déléter le gène *exsB* conduit à une diminution de la sécrétion de l'effecteur ExoS (Goranson et al. 1997). Cela suggère que ExsB a une activité sur le SST3. La protéine ExsB pourrait être impliquée dans la régulation de ce système, du fait de sa localisation génétique, ou bien elle pourrait être une pilotine pour la sécrétine PscC, comme son homologue chez *Yersinia spp.*

La sécrétine PscC du SST3 de *P. aeruginosa* est indispensable à l'activité du SST3. Elle possède 78% de similarité avec la sécrétine YscC de *Yersinia spp.* Il s'agit d'une protéine

membranaire. La nécessité d'une pilotine pour son oligomérisation et sa localisation dans la membrane externe n'a pas été décrite. Par contre, alors que PscC n'est pas une lipoprotéine, il a été démontré que la machinerie d'insertion des lipoprotéines dans la membrane externe, la voie Lol, est impliquée dans son assemblage (Hoang et al. 2011). En revanche, la délétion d'une autre machinerie, Bam, n'a aucune conséquence sur la sécrétine. En effet, une diminution très importante de la quantité de sécrétine PscC est observée en l'absence de la machinerie Lol. La voie Lol pourrait donc être impliquée, de façon indirecte, dans la stabilisation et/ou l'adressage à la membrane externe de PscC. Par comparaison avec l'assemblage d'autres sécrétines, et notamment celle du SST3 de *Shigella flexneri*, la sécrétine PscC pourrait interagir avec une petite lipoprotéine qui elle-même serait prise en charge par la machinerie Lol jusqu'à la membrane externe. Cette petite lipoprotéine serait une pilotine et pourrait être ExsB.

Finalement, il serait intéressant d'étudier l'implication de ExsB dans le SST3 de *P. aeruginosa* et de tenter de comprendre son mécanisme d'action.



# Chapitre II : Méthodologies mises en œuvre



Ce chapitre décrit les méthodes utilisées dans les études du rôle potentiel chez *Pseudomonas aeruginosa* de deux protéines, l'ATPase et la protéine ExsB dans le SST3. Outre les indispensables cultures bactériennes de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, des cultures cellulaires eucaryotes de différentes lignées ont été utilisées pour étudier l'activation et l'activité du SST3. Grâce aux outils de biologie moléculaire, des souches de *P. aeruginosa* délétées des gènes d'intérêt ont été construites pour analyser les effets de ces délétions sur le phénotype des bactéries. Les gènes d'intérêt ont aussi été clonés dans des plasmides chez *E. coli* puis chez *P. aeruginosa*, ou bien insérés directement dans le génome de *P. aeruginosa* afin d'obtenir des souches de *P. aeruginosa* exprimant les protéines d'intérêt à l'état sauvage, mutés ou bien fusionnés à différentes étiquettes protéiques qui facilitent leur étude.

Des méthodologies plus spécifiques à la protéine ExsB permettant la séparation, la purification, la localisation des protéines d'intérêt, leur immunomarquage ou la recherche des partenaires sont décrites. Les différentes méthodes de purification de l'ATPase sont détaillées ainsi que l'évaluation de l'activité de l'enzyme purifiée obtenue.

## ***I. Cultures bactériennes et cultures cellulaires***

### **A. Cultures bactériennes**

#### ***1) Cultures de Pseudomonas aeruginosa***

Les cultures solides de *P. aeruginosa* sont réalisées sur le milieu gélosé PIA (Pseudomonas Isolation Agar, de Difco). Ce milieu contient un agent anti-microbien : l'irgasan auquel *P. aeruginosa* est naturellement résistante.

Les cultures liquides sont réalisées dans du milieu LB (Luria Bertani), composé de 10g/L de tryptone, de 5g/L d'extrait de levure et de 10 g/L de chlorure de sodium (avec l'antibiotique correspondant pour les souches portant une cassette de résistance).

Après 15h à 37°C, 300 RPM, les suspensions bactériennes sont diluées à une D.O.<sub>600nm</sub> de 0,1 (soit  $0,6 \cdot 10^8$  bactéries) dans du milieu LB puis remises en culture à 37°C et 250 RPM. Le SST3 peut être activé par déplétion en calcium par ajout dans le milieu LB de 5 mM d'EGTA et 20 mM de MgCl<sub>2</sub> lors de la dilution à D.O.<sub>600nm</sub> 0,1. A l'inverse, pour les cultures non induites, 5mM de CaCl<sub>2</sub> est ajouté pour minimiser l'expression basale des protéines du SST3.



Les bactéries sont récoltées lorsqu'elles sont en phase exponentielle (D.O.<sub>600nm</sub> 1) pour toutes les analyses (expression et sécrétion de protéines, infection des cellules hôtes modèles, fractionnement cellulaire, ...).

### 2) Cultures d'*Escherichia coli*

La bactérie *E. coli* présente de nombreux avantages, en particulier sa facilité de manipulation et est donc un outil de choix en biologie moléculaire (amplification et purification de plasmides aisées).

Les souches d'*E. coli* sont mises en culture dans du milieu LB liquide. Elles peuvent aussi être cultivées sur des boîtes de pétri de LB agar, contenant 15 g/L d'agar. Pour les souches bactériennes portant une cassette de résistance, l'antibiotique approprié est ajouté aux milieux de culture.

### 3) Concentrations en antibiotiques utilisées pour les cultures bactériennes

Le tableau suivant présente les concentrations en antibiotiques utilisées pour les cultures de *E. coli* et *P. aeruginosa*.

Antibiotique (µg/mL)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	Milieux solide et liquide	Milieu liquide	Milieu solide
Ampicilline	100	-	-
Carbenicilline	-	300	500
Kanamycine	25	-	-
Tétracycline	10	200	200
Gentamycine	50	300	400

**Tableau 4 : Concentrations en antibiotiques utilisées pour la culture des bactéries**

*P. aeruginosa* étant naturellement résistante à l'ampicilline (Maris 1991), la carbénicilline, plus résistante à la dégradation par la  $\beta$ -lactamase, est utilisée en remplacement de l'ampicilline.

## B. Cultures cellulaires

Différentes lignées cellulaires sont utilisées pour réaliser les tests de cytotoxicité et les mesures de taux d'injection de toxines. Leurs conditions d'utilisation sont récapitulées dans le tableau ci-dessous (Tableau ). Les cellules sont toujours cultivées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, dans des

flasques de 25 ou 75 cm<sup>2</sup>. Le passage des cellules est effectué 2 fois par semaine : les cellules sont alors diluées dans du nouveau milieu à une concentration de 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> cellules/boîte de 75 cm<sup>2</sup>. Les milieux de cultures contiennent 10% de sérum fœtal de veau (décomplémenté par chauffage 30 min à 56°C) ainsi que 1% de pénicilline/streptomycine pour éviter les contaminations. Lors de l'utilisation des cellules pour des tests d'infection par *P. aeruginosa*, aucun antibiotique ne doit être présent dans le milieu de culture.

Cellules		Caractéristiques	Adhérence	Utilisation	Milieu de culture
J774	Lignée cellulaire	Macrophages de souris	oui	Test de cytotoxicité : relargage de LDH	DMEM
A549	Lignée cellulaire	Cellules épithéliales pulmonaires humaines	oui	Test de cytotoxicité : arrondissement cellulaire Taux d'injection de toxines	RPMI
BJAB	Lignée cellulaire	Cellules de type B, provenant d'un lymphome humain	non	Taux d'injection de toxines	
CHO	Lignée cellulaire	Cellules ovariennes d'hamster chinois	oui	Détection d'une toxine du SST3 dans le milieu extracellulaire lors d'infections	RPMI
HUVEC	Culture primaire	Cellules endothéliales de veines ombilicales humaines	oui	Test de cytotoxicité : rétraction cellulaire	EBM2

Tableau 5 : Conditions d'utilisation des différentes cellules eucaryotes pour l'étude de l'activité du SST3 dans ce travail

## ***II. Biologie moléculaire : délétion et introduction de gènes d'intérêt chez Pseudomonas aeruginosa***

La délétion et l'introduction de gènes d'intérêt dans la bactérie *P. aeruginosa* nécessitent une étape d'amplification de la séquence d'ADN d'intérêt, une étape de clonage de cette séquence dans un plasmide et enfin une étape de transformation de ce plasmide dans la bactérie *Escherichia coli*. Ce plasmide est ensuite introduit dans *P. aeruginosa* par deux stratégies différentes.

- i. La première consiste à purifier puis transformer le plasmide dans *P. aeruginosa*.
- ii. La seconde est une conjugaison triparentale, pour le transfert du matériel génétique contenu dans le plasmide de *E. coli* sur le chromosome de *P. aeruginosa*. Elle est utilisée pour une délétion ou une insertion génétique dans le génome de *P. aeruginosa*,

## A. Plasmides et souches de départ

La souche d'*E. coli* compétente utilisée pour les manipulations de biologie moléculaire est une souche commerciale de Invitrogen (One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*). La souche sauvage de *P. aeruginosa* est la souche CHA. Il s'agit d'un isolat clinique du CHU de Grenoble provenant d'un patient atteint de la mucoviscidose (Toussaint et al. 1993).

Les tableaux suivants (Tableau 6 ; Tableau 7) présentent les oligonucléotides et les plasmides utilisés durant la thèse.

Oligonucléotides			
Noms	Tm (°C)	Séquence	Utilisation
Delta_pscN_1		5' CCGGGCGCCTCGAGCTTCTGCTG	SOE PCR pour la délétion partielle de la séquence codant pour la protéine PscN
Delta_pscN_2		5' ATGGCGCTGATCCAGCGCCTGGTGCTGCTG	
Delta_pscN_3		5' TGGATCAGCGCCATGCGGCC	
Delta_pscN_4		5' CCGGGAGCGGAGCCGTATCCAC	
PscN_K176Af	80,3	5' CCGGGCGCGGC <b>GCC</b> AGCACCCCTGCTGG	Mutation de la lysine 176 de PscN en alanine
PscN_K176Ar	80,3	5' CCAGCAGGGTGCT <b>GCG</b> GCCGCCGCCGG	
PscN_K176Rf	80,3	5' CCGGGCGCGGC <b>CGC</b> AGCACCCCTGCTGG	Mutation de la lysine 176 de PscN en arginine
PscN_K176Rr	80,3	5' CCAGCAGGGTGCT <b>GCG</b> GCCGCCGCCGG	
PscN_R360Df	81,3	5' CGTGCTGCACTCGGTGAGC <b>GAC</b> GTCAATGAACCAGATCG	Mutation de l'arginine 350 de PscN en aspartate
PscN_R360Dr	81,3	5' CGATCTGGTTCATGAC <b>GTC</b> GCTCACCGAGTGCAGCACG	
NdeI_Strep_PscN	75,8	5' AACCATA <b>T</b> GGCCAGCTGGAGCCACCCG <b>C</b> AGTTCGA GAAGCCGGGCATGCCCGCGCTCTCTCTCCTC	Ajout d'une étiquette Strep et du site de restriction NdeI à l'extrémité N terminale de pscN
PscN_Hind	87,9	5' TGA <b>AAGCTT</b> TCATGCGCAGAGGCTCCGCAACTGCGCG	Apport du site de restriction HindIII à l'extrémité C terminale de pscN
NdeI_PscN	71,3	5' AACCATA <b>T</b> CCCCGCGCTCTCTCTCCTC	Apport du site de restriction NdeI à l'extrémité N terminale de pscN
PscN_Strep_Hind	86,6	5' TGA <b>AAGCTT</b> TCAGGCCTTCTCGAACTGCGGGTGGCTC CAGCTCGGGCCTGCGCAGAGGCTCCGCAACTGCGCG	Ajout d'une étiquette Strep et du site de restriction HindIII à l'extrémité C terminale de pscN
Delta_exsB_1	71,9	5' <b>CCCGGG</b> GATGTGCTGGGCGAGGGG	SOE PCR pour la délétion de la séquence codant pour la protéine ExsB
Delta_exsB_2	71,9	5' GGCAATGTATCACATCCAGCACCTACCTGCG	
Delta_exsB_3	71,4	5' GTGCTGGATGTGATACATTGCTGCTGTTTCGGA	
Delta_exsB_4	72,9	<b>CCCGGG</b> CCGAAGCGCTGGACGAAGC	
ExsB_Hind	64,4	<b>AAGCTT</b> CAATCGTTGCCAGATCTTTC	Apport du site de restriction HindIII à l'extrémité C terminale de exsB
Nde_ExsB	63,9	<b>CATA</b> TGGTGAGGTGCTGGATGCTG	Apport du site de restriction NdeI à l'extrémité N terminale de exsB
ExsB_Strep_Hind	65,7	5' <b>AAGCTT</b> TCAGGCCTTCTCGAACTGCGGGTGGCTCCA GCTCCAGCTCGGGCCATCGTGGCAGATCTTCTTCC	Ajout d'une étiquette Strep et du site de restriction HindIII à l'extrémité C terminale de exsB
Xba_RBS_ExsB	65,9	5' <b>CTAGA</b> ACGCCGCTGGAGGC	Apport du site de restriction XbaI en amont du RBS de exsB
SmaI_RBS_pscC	69,7	5' <b>CCCGGG</b> AGCTAGGAATTCGGGAGGC	Apport du site de restriction SmaI en amont du RBS de pscC
pscC_SpeI	70,1	5' <b>ACTAG</b> ATTCCCGCGCTCCGCG	Apport du site de restriction SpeI à l'extrémité C terminale de pscC

Tableau 6 : Oligonucléotides utilisés.

Les sites de restriction ajoutés sont soulignés, les mutations introduites sont notées en gras et souligné, et les étiquettes Strep sont représentées en gras.

Plasmides disponibles au laboratoire				
Nom	Caractéristiques		Résistance	Provenance
pIA60	Plasmide dérivé de pUC18, contenant les opérons <i>pcrGVHpopBD</i> et <i>exsCEBA</i> de la souche CHA clonés en EcoRI		Amp/Cb	(Dacheux et al., 2001)
pIApC	Plasmide dérivé de pUCP20, utilisé pour l'expression de protéines sous le contrôle du promoteur pC, le promoteur de l'opéron <i>exsCEBA</i>		Amp/Cb	(Dacheux et al., 2001)
pIApG	Plasmide dérivé de pUCP20, utilisé pour l'expression de protéines sous le contrôle du promoteur pG, le promoteur de <i>pscN</i>		Amp/Cb	(Gouré et al., 2004)
pS GFP	Plasmide pour l'expression de la GFP sous le contrôle du promoteur pS, promoteur de l'effecteur ExoS		Amp/Cb	Laboratoire (non publié)
pExoS-bla	Plasmide utilisé pour l'expression de la toxine ExoS fusionnée à la β-lactamase sous le contrôle de son promoteur pS		Amp/Cb	(Verove et al 2012)
pDD2	Plasmide dérivé de pUCP20 pour la surexpression constitutive de ExsA, l'activateur transcriptionnel du SST3		Amp/Cb	(Dacheux et al, 1999)
pJN105	Plasmide contenant le promoteur pBad pour l'expression de gènes inductible à l'arabinose		Gm	(Newman et Fuqua, 1999)
miniCTX	Plasmide pour l'intégration chromosomique au niveau du site d'attachement <i>attB</i> de <i>P. aeruginosa</i>		Tc	(Hoang et al., 2000)
pTOPO	Plasmide pour le clonage à bouts francs de produits de PCR		Km	Invitrogen
pEX100T	Plasmide codant pour la levansaccharase, pour l'intégration chromosomique par recombinaison homologue chez <i>P. aeruginosa</i>		Gm	(Schweizer et Hoang, 1995)
pRK2013	Plasmide « helper » utilisé pour permettre la conjugaison d'un plasmide chez <i>P. aeruginosa</i>		Km	(Ditta et al., 1980)
pFLp2	Plasmide codant pour la FLP recombinase permettant l'excision des séquences d'ADN (par exemple de mini CTX) comprises entre les sites cibles de cette enzyme et pour la levansaccharase		Amp/Cb	(Hoang et al., 1998)
Plasmides utilisés pour l'étude de l'ATPase PscN dans <i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
Nom	Construction	Utilisation	Résistance	Provenance
pTOPO Δ <i>pscN</i>	SOE PCR sur l'ADN chromosomique de CHA	Clonage d'un fragment de la séquence délétée des 888 bp centrales de <i>pscN</i> chez <i>E. coli</i>	Km	Laboratoire
pEX100T Δ <i>pscN</i>	pEX100T digéré par SmaI et pTOPO Δ <i>pscN</i> digéré par EcoRI et traité klenow	Délétion partielle de la séquence codant pour PscN dans le chromosome de <i>P. aeruginosa</i>	Amp/Cb	Laboratoire
pTOPO <i>pscN</i>	Amplification de <i>pscN</i> par PCR	Clonage du produit de PCR <i>pscN</i> dans pTOPO chez <i>E. coli</i>	Km	IBS
pET15b <i>pscN</i>	pTOPO <i>pscN</i> et de PET 15b digérés par NdeI et XhoI	Expression de His-PscN sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG chez <i>E. coli</i>	Amp	Laboratoire
pIApG <i>pscN</i>	pIApG et pET15b <i>pscN</i> digérés par NdeI et HindIII	Expression de PscN sous le contrôle du promoteur pG chez <i>P. aeruginosa</i>	Amp/Cb	Laboratoire
pIApG <i>his-pscN</i>	pIApG et pET15b <i>pscN</i> digérés par XbaI et HindIII	Expression de PscN avec une étiquette Histidine sous le contrôle du promoteur pG chez <i>P. aeruginosa</i>	Amp/Cb	Laboratoire
pIApG <i>his-pscN</i> <sub>K176A</sub>	Mutagenèse dirigée avec les oligonucléotides K176Af et K176Ar à partir du plasmide pIApG <i>his-pscN</i>	Expression de PscN mutée en K176A avec une étiquette Histidine sous le contrôle du promoteur pG chez <i>P. aeruginosa</i>	Amp/Cb	Ce travail
pIApG <i>his-pscN</i> <sub>K176R</sub>	Mutagenèse dirigée avec les oligonucléotides K176Rf et K176Rr à partir du plasmide pIApG <i>his-pscN</i>	Expression de PscN mutée en K176R avec une étiquette Histidine sous le contrôle du promoteur pG chez <i>P. aeruginosa</i>	Amp/Cb	Ce travail
pIApG <i>his-pscN</i> <sub>R360D</sub>	Mutagenèse dirigée avec les oligonucléotides R360f et R360r à partir du plasmide pIApG <i>his-pscN</i>	Expression de PscN mutée en R360D avec une étiquette Histidine sous le contrôle du promoteur pG chez <i>P. aeruginosa</i>	Amp/Cb	Ce travail

Plasmides utilisés pour l'étude de l'ATPase PscN dans <i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
Nom	Construction	Utilisation	Résistance	Provenance
pTOPO strep-pscN	Amplification via les oligonucléotides NdeI Strep-PscN et PscN HindIII à partir du plasmide pIApG pscN	Clonage de l'étiquette Strep en N terminal de PscN chez <i>E. coli</i>	Km	Ce travail
pTOPO pscN-strep	Amplification via les oligonucléotides NdeI PscN et PscN-Strep HindIII à partir du plasmide pIApG pscN	Clonage de l'étiquette Strep en C terminal de PscN chez <i>E. coli</i>	Km	Ce travail
pIApG his-strep-pscN	pIApG his-pscN et pTOPO strep-pscN digérés par NdeI et NotI	Expression de PscN fusionnée à des étiquettes Histidine et Strep en N terminal sous le contrôle du promoteur pG chez <i>P. aeruginosa</i>	Amp/Cb	Ce travail
pIApG strep-pscN	pIApG pscN et pTOPO strep-pscN digérés par NdeI et NotI	Expression de PscN fusionnée à une étiquette Strep en N terminal sous le contrôle du promoteur pG chez <i>P. aeruginosa</i>	Amp/Cb	Ce travail
pIApG his-pscN-strep	pIApG his-pscN et pTOPO pscN-strep digérés par NdeI et HindIII	Expression de PscN fusionnée à une étiquette Histidine en N terminal et à une étiquette Strep en C terminal sous le contrôle du promoteur pG chez <i>P. aeruginosa</i>	Amp/Cb	Ce travail
Plasmides utilisés pour l'étude de la protéine ExsB dans <i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
Nom	Construction	Utilisation	Résistance	Provenance
pTOPO ΔexsB	SOE PCR sur pIA60 avec les oligonucléotides Delta_exsB_1, 2, 3, 4	Clonage d'un fragment de la séquence de l'opéron exsCEBA délétée de exsB chez <i>E. coli</i>	Km	Ce travail
pEX100T ΔexsB	pEX100T digéré par SmaI et pTOPO ΔexsB digéré par EcoRI et traité klenow	Délétion de la séquence codant pour ExsB dans le chromosome de <i>P. aeruginosa</i>	Amp/Cb	Ce travail
pTOPO exsB	Amplification avec les oligonucléotides Nde_exsB et exsB_Hind à partir du plasmide pIA60	Clonage de exsB chez <i>E. coli</i>	Km	Ce travail
pTOPO RBS exsB	Amplification avec les oligonucléotides Xba_RBS_exsB et exsB_Hind à partir du plasmide pIA60	Clonage de exsB et de son RBS chez <i>E. coli</i>	Km	Ce travail
pIApC exsB	pIApC et pTOPO exsB digérés par NdeI et HindIII	Expression de ExsB sous le contrôle du promoteur pC dans <i>P. aeruginosa</i>	Amp/Cb	Ce travail
pIApC RBS exsB	pIApC et pTOPO RBS exsB digérés par NdeI et HindIII	Expression de ExsB sous le contrôle du promoteur pC et de son RBS dans <i>P. aeruginosa</i>	Amp/Cb	Ce travail
miniCTX pC RBS exsB	mini CTX et pIApC RBS exsB digérés par SmaI et HindIII	Expression chromosomique de ExsB sous le contrôle du promoteur pC et de son RBS dans <i>P. aeruginosa</i>	Tc	Ce travail
pEXG2 ΔpscC		Délétion du gène pscC dans le chromosome de <i>P. aeruginosa</i>	Gm	Arne Rietch
pP37 pscC		Expression de PscC sous contrôle d'un promoteur inducible à l'IPTG chez <i>P. aeruginosa</i>	Gm	Arne Rietch
pTOPO exsB strep	Amplification avec les oligonucléotides Nde_exsB et exsB_Strep_Hind à partir du plasmide pIA60	Clonage du gène codant pour ExsB fusionnée à une étiquette Strep en C terminal chez <i>E. coli</i>	Km	Ce travail

Plasmides utilisés pour l'étude de la protéine ExsB dans <i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
Nom	Construction	Utilisation	Résistance	Provenance
pApC <i>exsB strep</i>	pApC et pTOPO <i>exsB strep</i> digérés par NdeI et HindIII	Expression de ExsB fusionnée à une étiquette Strep en C terminal, sous le contrôle du promoteur pC dans <i>P. aeruginosa</i>	Amp/Cb	Ce travail
pApC <i>RBS exsB strep</i>	pApC <i>exsB strep</i> et pApC <i>RBS exsB</i> digérés par Accl	Expression de ExsB fusionnée à une étiquette Strep en C terminal, sous le contrôle du promoteur pC et de son RBS dans <i>P. aeruginosa</i>	Amp/Cb	Ce travail
pTOPO <i>RBS exsB mCherry</i>	Synthèse par la société Genescript du gène de fusion Sma_ <i>RBS exsB Spe mCherry Sac</i>	Clonage du gène codant pour ExsB fusionnée à une étiquette fluorescente mCherry en C terminal, ainsi que son RBS, chez <i>E. coli</i>	Km	Ce travail
pTOPO <i>RBS exsB sfGFP</i>	Synthèse par la société Genescript du gène de fusion Sma_ <i>RBS exsB Spe sfGFP Sac</i>	Clonage du gène codant pour ExsB fusionnée à une étiquette fluorescente sfGFP en C terminal, ainsi que son RBS, chez <i>E. coli</i>	Km	Ce travail
pJN105 <i>RBS exsB mCherry</i>	pJN105 et pTOPO <i>RBS exsB mCherry</i> digérés par SmaI et SacI	Expression plasmidique de ExsB fusionnée à une étiquette fluorescente mCherry en C-terminal sous le contrôle de son RBS et d'un promoteur inducible à l'arabinose chez <i>P. aeruginosa</i>	Gm	Ce travail
pSW196 <i>RBS exsB mCherry</i>	pSW196 et pJN105 <i>RBS exsB mCherry</i> digérés par SmaI et SacI	Expression chromosomique de ExsB fusionnée à une étiquette fluorescente mCherry en C terminal sous le contrôle de son RBS et d'un promoteur inducible à l'arabinose chez <i>P. aeruginosa</i>	Tc	Ce travail
pJN105 <i>RBS exsB sfGFP</i>	pJN105 et pTOPO <i>RBS exsB sfGFP</i> digéré par SmaI et SacI	Expression plasmidique de ExsB fusionnée à une étiquette fluorescente sfGFP en C terminal sous le contrôle de son RBS et d'un promoteur inducible à l'arabinose chez <i>P. aeruginosa</i>	Gm	Ce travail
pTOPO <i>RBS pscC</i>	Amplification avec les oligonucléotides Sma_ <i>RBS pscC</i> et <i>pscC Spe</i> à partir du plasmide pP37 <i>pscC</i>	Clonage du gène codant pour PscC fusionnée à une étiquette fluorescente mCherry en C terminal, ainsi que son RBS, chez <i>E. coli</i>	Km	Ce travail
pJN105 <i>RBS pscC sfGFP</i>	pTOPO <i>RBS pscC</i> et pJN105 <i>RBS exsB sfGFP</i> digérés par SmaI et HindIII	Expression plasmidique de PscC fusionnée à une étiquette fluorescente sfGFP en C terminal sous le contrôle de son RBS et d'un promoteur inducible à l'arabinose chez <i>P. aeruginosa</i>	Gm	Ce travail

**Tableau 7 : Plasmides utilisés**

*Construction et caractéristiques détaillées des plasmides, ainsi que résistance aux antibiotiques conférée (Amp/Cb : ampicilline chez E. coli et carbenicilline chez P. aeruginosa, Gm : gentamycine, Km : kanamycine, Tc : tétracycline)*  
*Purification d'ADN plasmidique : mini ou midi préparations*

## **B. Purification d'ADN plasmidique : mini ou midi préparations**

Les mini préparations permettent de purifier de petites quantités d'ADN plasmidique (environ 7,5 µg d'ADN dans 50µL). Des plasmides très purs peuvent être préparés avec le kit « NucleSpin Plasmid» de Macherey-Nagel. Les plasmides peuvent également être purifiés selon la procédure décrite par (Birnboim et al. 1979). Dans ce cas-là, les culots bactériens sont lysés par un mélange de NaOH et SDS, puis les protéines sont éliminées par précipitation à l'acétate de potassium. Ensuite, l'ADN est précipité dans de l'isopropanol puis de l'éthanol à 70% avant d'être mis en suspension dans de l'eau ultrapure contenant de la RNase. Les préparations sont alors un peu moins pures et sont en général utilisées pour vérifier la présence de l'insert d'intérêt. Lorsque des quantités plus importantes de plasmides doivent être utilisées, des midi-préparations sont effectuées grâce au kit Qiagen Plasmid Midi kit.

## **C. Analyse de l'ADN sur gel d'agarose ou d'acrylamide**

Les fragments d'ADN sont analysés sur des gels à 0,8% d'agarose et avec 0,01% (v/v) de SYBR green (un agent intercalant de l'ADN). Après 1h30 de migration à 100V, les gels sont déposés sur une table à UV afin de visualiser l'ADN. Les fragments d'ADN trop petits pour être visualisés sur des gels d'agarose sont déposés sur des gels à 5% d'acrylamide. Dans ce cas, la migration dure seulement 20 min et les gels doivent ensuite être incubés dans une solution contenant 50µL/L de bromure d'éthyldium durant 15 min pour révéler l'ADN.

## **D. Amplification des fragments d'ADN par PCR**

L'objectif est d'ajouter de petites étiquettes protéiques (6-histidine, strep tag) aux extrémités N ou Cterminales des protéines d'intérêt, ou bien des sites de restriction pour permettre le clonage. Les fragments d'ADN sont amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction), à partir d'un plasmide contenant le gène codant pour la protéine d'intérêt. Pour cela, une ADN polymérase thermostable de haute fidélité (kit Advantage GC rich et Phusion) synthétise la séquence de nucléotides présente entre les deux oligonucléotides choisis (un dans chaque sens), à partir du plasmide servant de matrice, au cours des différents cycles. Les séquences présentes dans les oligonucléotides sont ainsi introduites à chaque extrémité du fragment d'ADN amplifié. Les cycles sont les suivants :

	Température (°C)	Durée	Rôle
Cycles Répétés 30 fois	95°C	1 min	Dénaturation initiale de l'ADN
	95°C	30s	Dénaturation (ouverture de l'ADN double brin)
	T <sub>m</sub>	30s	Hybridation des oligonucléotides choisis sur le brin d'ADN complémentaire
	T <sub>opt</sub>	30s x taille (kbp) du fragment à amplifier	Elongation
	T <sub>opt</sub>	10 min	Elongation finale

T<sub>m</sub> = « melting temperature » = température d'hybridation de l'oligonucléotide

T<sub>opt</sub> = température optimale pour l'ADN polymérase, 68 ou 72°C

**Tableau 8 : Cycles de PCR utilisés pour l'amplification d'une séquence d'ADN d'intérêt**

En général, les oligonucléotides sont choisis de sorte à présenter un site de restriction de part et d'autre du fragment à amplifier, pour faciliter ensuite son clonage dans le plasmide souhaité. La température d'hybridation des oligonucléotides est calculée en ligne avec le calculateur de Finnzymes. Pour vérifier si la PCR a bien fonctionné, les échantillons sont analysés sur gel d'agarose ou d'acrylamide.

Les gènes *exsB* fusionnés aux gènes des protéines fluorescentes mCherry et sfGFP ont été obtenus par Genescript ([www.genescript.com](http://www.genescript.com)).

### E. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée (kit Quick change II mutagenesis kit, Agilent) permet d'obtenir des mutations ponctuelles. Le principe repose sur le choix d'une paire d'oligonucléotides complémentaires possédant, au milieu de leur séquence, la mutation désirée. Ils doivent être longs de 25 à 45 bases. Leur température d'hybridation T<sub>m</sub> est calculée de la façon suivante et doit être supérieure ou égale à 78°C :

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - \frac{675}{\text{nombre.de.bases.de.l.oligonucleotide}} - \%mismatch.$$

Le cycle de PCR utilisé est le suivant :

	Température (°C)	Durée	Rôle
Cycles Répétés 18 fois	95°C	5 min	Dénaturation initiale de l'ADN
	95°C	30s	Dénaturation (ouverture de l'ADN double brin)
	55°C	1 min	Hybridation des oligonucléotides
	68 °C	1min x nombre de bases à amplifier	Elongation
	68°C ou 72°C	10 min	Elongation finale

**Tableau 9 : Conditions de PCR utilisées pour la mutagenèse dirigée**

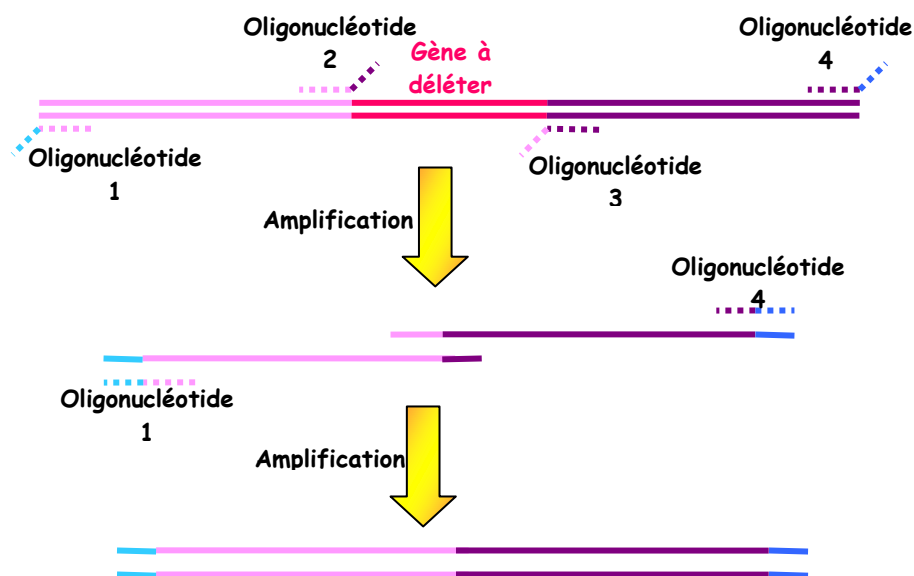


Suite à la PCR, l'ensemble du plasmide servant de matrice est amplifié, avec la mutation souhaitée.

### F. Délétion d'un gène : la SOE PCR

La technique de la SOE PCR ou « Slice Overlapping Extension Polymerase Chain Reaction » permet d'obtenir un fragment d'ADN comportant une délétion interne, par exemple une délétion d'un gène d'intérêt.

La première PCR conduit à l'amplification de la partie amont du gène à déléter, et la deuxième à l'amplification de la partie en aval du gène à déléter. Les oligonucléotides nécessaires à ces amplifications sont choisis comme représenté sur le schéma ci-dessous (oligonucléotide 1 et 2 pour la première PCR et 3 et 4 pour la seconde). Les deux produits de PCR sont capables de s'hybrider du fait d'une séquence identique au niveau de la séquence d'ADN à déléter, introduite sur les oligonucléotides 2 et 3.



**Figure 27 : Principe de la SOE PCR pour la délétion d'une séquence d'ADN.**  
*Les sites de restriction sont représentés en bleu*

Une dernière PCR est réalisée en utilisant comme matrice les deux fragments d'ADN obtenus lors des deux précédentes amplifications et les oligonucléotides situés à chaque extrémité (oligonucléotides 1 et 4).

Le fragment ainsi obtenu est cloné dans le plasmide pTOPO puis dans un plasmide spécifique, appelé pEX100T.

### G. Clonage du fragment d'intérêt dans un plasmide

Les fragments d'intérêt obtenus par PCR sont directement clonés dans le plasmide pTOPO (kit Zero blunt-end TOPO, Invitrogen). Ce plasmide, qui sert d'intermédiaire avant le clonage dans le vecteur souhaité, présente l'avantage d'être facile à séquencer et à purifier en grande quantité.

Le plasmide est ensuite transformé dans *Escherichia coli* TOP10 (fournies) par choc thermique. Il porte le gène de résistance à la kanamycine, permettant la sélection des colonies effectivement transformées.

Après vérification de la séquence, deux digestions sont réalisées en parallèle avec les mêmes enzymes, à 37°C pendant 2h :

- ④ le plasmide donneur pTOPO-insert, coupé au niveau des sites de restriction situés de part et d'autre de l'insert
- ④ le plasmide receveur qui va recevoir l'insert:
  - pIApC ou pIApG pour l'expression du gène d'intérêt sous le contrôle du promoteur du SST3 de *P. aeruginosa* pC ou pG
  - pJN105 pour l'induction de l'expression du gène d'intérêt par l'arabinose
  - pEX100T, PEXG2 ou miniCTX pour une future insertion du gène d'intérêt dans le chromosome de *P. aeruginosa*.

Les enzymes sont ensuite inactivées par la chaleur, puis le plasmide receveur est déphosphorylé par un traitement à la phosphatase alcaline (rAPid Alkaline Phosphatase, Roche) afin d'éviter qu'il ne se referme sur lui-même. Cette phosphatase alcaline est elle aussi inactivée par la chaleur. Si nécessaire, les fragments à utiliser pour la ligation peuvent être séparés sur gel d'agarose puis purifiés sur gel grâce au kit « NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up » de Macherey-Nagel.

L'étape de ligation permet de lier l'insert provenant du plasmide donneur au plasmide receveur. Pour cela, sont incubés 5 minutes à température ambiante 5µL de tampon ligase, 0,5µL de ligase (fournis dans le kit « Quick ligation » de Biolabs) et 4,5µL d'ADN sachant qu'il faut 3 fois plus d'insert que de receveur (en concentration molaire).

Ce plasmide est ensuite transformé dans *E. coli* TOP10 puis purifié et transformé dans *P. aeruginosa*.

**H. Transformation dans *E. coli* puis dans *P. aeruginosa****1) Transformation dans E. coli*

Les bactéries compétentes *E. coli* TOP 10 (de Invitrogen) sont décongelées délicatement dans la glace puis environ 300 ng de plasmide sont ajoutés. Suite à une incubation de 30 min dans la glace, le choc thermique dure 30s à 42°C. Après retour sur la glace, 250µL de milieu SOC préchauffé à 37°C sont ajoutés et les bactéries mises sous agitation à 200 RPM et 37°C pendant 1 heure. Enfin, 50µL et 250µL de culture bactérienne sont étalées sur des boîtes de LB + Antibiotique, et sont incubées 16 heures à 37°C.

Les colonies qui arrivent à se développer en présence de l'antibiotique portent bien le plasmide.

Dans le cas de la transformation du plasmide pEX100T, les cellules sont étalées sur des boîtes de LB + Ampicilline + 40µL d'IPTG 0,1 M + 40µL de X-galactose 2%. Le screening des colonies est effectué selon leur couleur puisque le plasmide pEX100T porte le gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase.

Lorsque l'insert n'est pas présent, l'IPTG active le gène de la  $\beta$ -galactosidase et l'enzyme ainsi exprimée hydrolyse son substrat, le X-galactose, en un produit bleu : les colonies obtenues sont bleues.

Au contraire, lorsque l'insert est bien présent, les colonies sont blanches car la  $\beta$ -galactosidase ne peut être exprimée car l'insert a été introduit dans le gène codant pour cette enzyme.

*2) Transformation dans P. aeruginosa*

Après avoir centrifugé 1mL d'une culture d'environ 15h de *Pseudomonas aeruginosa* à 8000 g pendant 1 minute, les bactéries sont reprises dans 1 mL de MgCl<sub>2</sub> à 0,1M glacé. Une autre centrifugation est réalisée, pendant 45s à 8000 g et le culot remis en suspension dans 1 mL de TG Salts glacé (6 mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub> et 15% glycérol (m/v)). Enfin, après centrifugation 2 fois 45 s à 8000 g, le culot bactérien est repris dans 200µL de TGSalts glacé et 100µL sont aliquotés dans un microtube froid. Environ 150ng du plasmide purifié est incubé avec ces cellules compétentes pendant 15 minutes dans la glace, puis un choc thermique de 2 minutes à 37°C suivi par 2 minutes dans la glace est effectué. 500 µL de milieu LB préchauffé est ajouté et, après une incubation 30 minutes à 37°C et 200RPM, les bactéries sont étalées sur des boîtes de PIA + Antibiotique et incubées pendant 16 heures à 37°C.

### I. Insertion chromosomique par conjugaison triparentale

La séquence d'intérêt, présente dans les plasmides pEX100T, pEXG2 ou miniCTX chez *E. coli*, est transférée sur le chromosome de *P. aeruginosa*. Cette insertion chromosomique est indispensable à la délétion de gènes d'intérêt mais peut aussi être utilisée pour l'expression de gènes en *trans*. Elle se fait grâce à une conjugaison triparentale, impliquant les souches bactériennes suivantes :

- La souche receveuse de *P. aeruginosa*
- La souche donneuse de *E. coli* portant le plasmide pEX100T, pEXG2 ou miniCTX avec l'insert
- La souche mobilisatrice de *E. coli* portant le plasmide « helper » pRK2013.

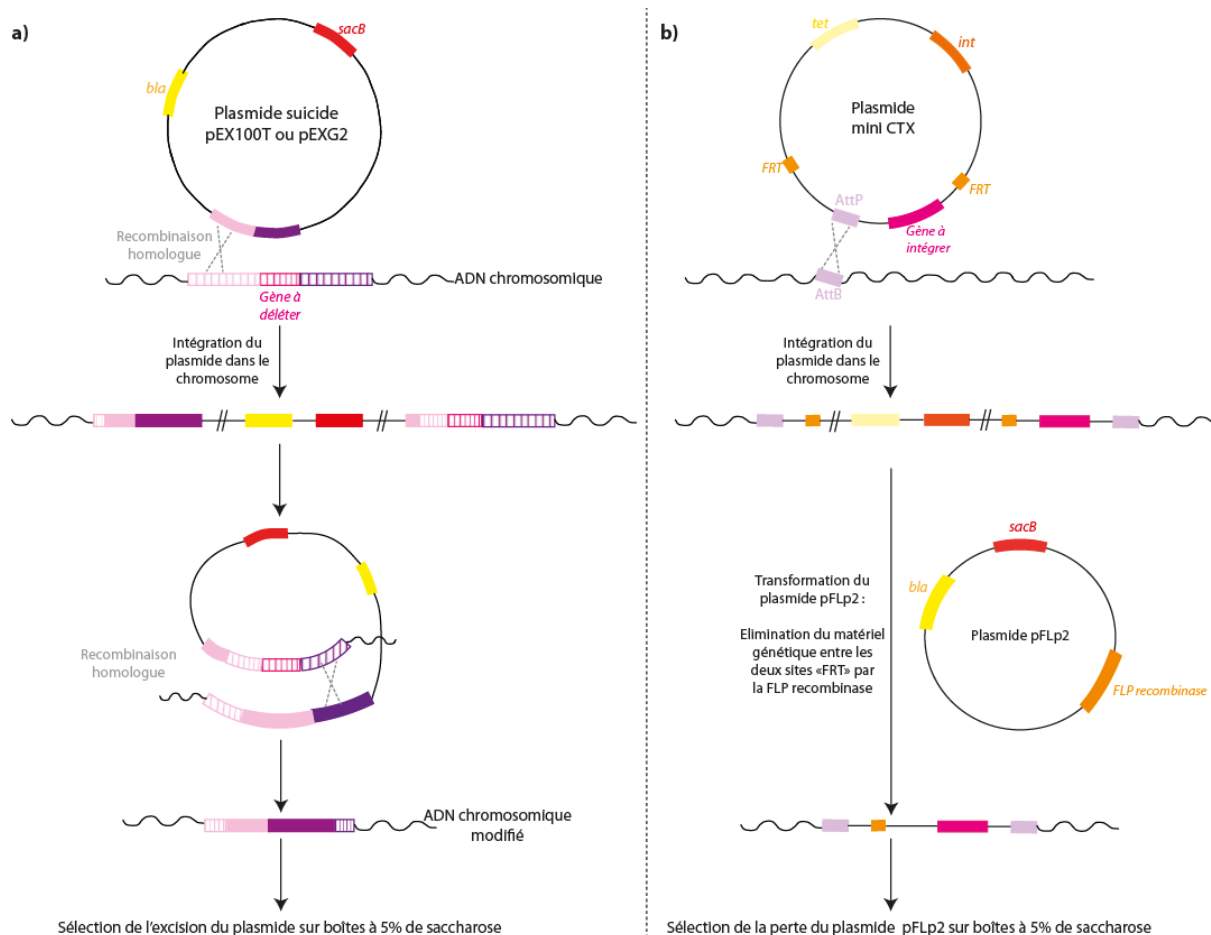
30 µL de culture sur la nuit de chaque souche de *E. coli* sont déposés sur une boîte de LB sèche pour former une goutte. Cette goutte est incubée pendant 2h à 37°C. Ensuite 30 µL de la culture de *P. aeruginosa* incubée pendant 2h à 42°C sont ajoutés à la goutte. Une incubation pendant 6h à 37°C permet le transfert du matériel génétique de *E. coli* dans *P. aeruginosa*.

Lorsque les plasmides pEX100T ou pEXG2 sont utilisés, l'intégration dans le chromosome se fait par recombinaison homologue au niveau des séquences identiques sur l'insert et sur le chromosome, comme représenté sur la figure ci-dessous. L'antibiotique utilisé pour sélectionner les clones est la gentamycine. Les plasmides pEX100T et pEXG2 portent le gène codant pour la levane-saccharase, enzyme permettant la transformation du saccharose en lévane, composé très toxique pour les bactéries à Gram négatif. L'étalement sur PIA saccharose 5% permet donc la sélection des clones ayant excisé la séquence d'ADN codant pour la levane-saccharase et la résistance à l'antibiotique, par une seconde recombinaison homologue.

Lorsque le plasmide miniCTX est utilisé, il est intégré au chromosome via ses sites d'attachement *att*. Les clones sont sélectionnés sur des boîtes de PIA Tétracycline puis transformés avec le plasmide pFLp2. Ce plasmide code pour une recombinase, permettant d'exciser la séquence du miniCTX comprise entre ses sites de reconnaissance, c'est-à-dire la séquence contenant la résistance à l'antibiotique. Le plasmide pFLp2 code également pour une levane-saccharase. La présence de levane-saccharase est donc létale pour les bactéries

lorsqu'elles sont cultivées en présence de saccharose (Gay et al. 1985). La sélection des clones ayant perdu le plasmide pFLp2 se fait donc sur PIA saccharose 5%.

Après la sélection sur saccharose 5%, les colonies sont étalées sur PIA et sur PIA + antibiotique pour vérifier la perte de résistance à l'antibiotique.



**Figure 28 : Principe de l'insertion ou la délétion de séquences d'ADN dans le chromosome de *P. aeruginosa***

**a) Principe de la délétion d'une séquence d'ADN du chromosome de *P. aeruginosa* b) Principe de l'insertion d'une séquence d'ADN dans le chromosome de *P. aeruginosa***

## J. Vérification de la présence de la séquence d'ADN souhaitée

Dans un premier temps, la présence de l'insert souhaité peut être vérifiée par PCR sur colonie ou bien par digestion enzymatique.

Le principe de la PCR sur colonie est le même que la PCR mais la matrice d'ADN est apportée directement par les bactéries. Les oligonucléotides utilisés sont situés de part et d'autre de la séquence recherchée. En général, ce sont donc les mêmes que ceux utilisés pour amplifier l'insert. Les bactéries sont ajoutées avec une pointe au mix de PCR et lysées par

chauffage à 98°C pendant 15 minutes. La DNA polymerase est ensuite ajoutée et les cycles habituels de PCR utilisés. Pour la vérification de la délétion d'un gène, des oligonucléotides extérieurs à ceux utilisés pour la SOE PCR doivent être utilisés.

La digestion par des enzymes de restriction est également très utilisée pour vérifier la présence d'une séquence d'ADN d'intérêt dans un plasmide. Des enzymes de restriction permettant un clivage de part et d'autre de l'insert, ou bien à l'intérieur de l'insert, sont incubées avec le plasmide purifié. La taille des fragments digérés permet de confirmer la présence de l'insert.

Une fois que la présence de l'insert est confirmée, il est important de procéder à un séquençage de la séquence d'ADN afin de vérifier l'absence d'erreur. Le séquençage est effectué par la société Cogenics.

### ***III. Caractérisation biochimique des protéines***

Les échantillons, tels que des extraits bactériens, des surnageants de cultures, des fractions membranaires, ... sont analysés par électrophorèse en conditions dénaturantes et Western blots afin de détecter et d'évaluer la quantité des protéines qu'ils contiennent. Pour améliorer la détection spécifique de la protéine ExsB, les anticorps dirigés contre cette protéine ont dû être purifiés.

#### **A. Electrophorèse et Western blots**

Du bleu de charge de protéines (1X : 50 mM Tris HCl pH 6,8 ; 2% SDS ; 10% glycérol ; 100mM DTT ; 0,1% bleu de bromophénol) est ajouté aux échantillons. Pour les échantillons correspondant aux bactéries totales, celles-ci sont reprises dans un volume de bleu de charge 10 fois plus petit que leur volume initial. Les échantillons sont dénaturés 10 minutes à 100°C puis analysés par électrophorèse SDS-PAGE, sur des gels à 8, 12 ou 15% de polyacrylamide.

Les protéines sont soit colorées (bleu de Coomassie ou nitrate d'argent), soit analysées par Western blots.

La coloration est réalisée par incubation du gel pendant 30 minutes avec une solution de bleu de Coomassie (1g/L de bleu de Coomassie, 10% d'acide acétique (v/v) et 40%

d'éthanol (v/v)), suivi par un rinçage dans une solution à 7,5% d'acide acétique et 25% d'éthanol.

Pour une plus grande sensibilité, les protéines peuvent également être colorées à l'argent. Pour cela, le gel est lavé pendant 30 minutes dans une solution à 40% d'éthanol (v/v) et 10% d'acide acétique (v/v) puis incubé pendant 30 minutes dans une solution à 30% d'éthanol (v/v), 68 g/L d'acétate de sodium, 2 g/L de thiosulfate de sodium. Après 3 rinçages de 5 minutes à l'eau distillée, le gel est incubé durant 40 minutes dans la solution à l'argent (1 g/L de nitrate d'argent, 200 µL/L de formaldéhyde). La révélation se fait avec la solution de développement (32,5 g/L de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 200µL/L de formaldéhyde).

Pour les Western blots, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 1h30 à 125 mA grâce au système « X Cell Blot Module » de Invitrogen. Pour les grosses protéines de plus de 100 kDa, le transfert est effectué sur une membrane PVDF pendant 3h30 à 300 mA grâce au système « Mini trans-blot electrophoretic transfer cell » de Biorad. Après incubation avec les anticorps primaires, les anticorps secondaires associés à la HRP sont ajoutés (Tableau 10). Le kit GE Healthcare permet la détection des protéines par chimioluminescence.

Anticorps	Dilution	Espèces	Provenance
PscN	1000	Lapin	Laboratoire (Eurogentec)
PscQ	3000	Cochon d'inde	Laboratoire (Eurogentec)
PscC	3000	Cochon d'inde	Laboratoire (Eurogentec)
PopB	10000	Lapin	Gouré et al, 2005
PopD	1000	Lapin	Gouré et al, 2005
PcrV	3000	Lapin	Gouré et al, 2005
ExsA	1000	Lapin	Thibault et al., 2009
ExsB	2000	Lapin	Laboratoire (Covalab)
RpoA	1000	Souris	NeoClone
DsbA	20000	Lapin	Donné par S. de Bentzmann
XcpY	1000	Lapin	Donné par R. Voulhoux
MexB	500	Lapin	Donné par N. Gotoh
OprI-F	2500	Souris	Donné par H. E. Gilleland
β-lactamase	3000	Lapin	Millipore
GFP	2500	Souris	Sigma-Aldrich
mCherry	1000	Souris	Clontech
His	6000	Souris	Sigma-Aldrich
Strep	1000	Souris	Novagen

**Tableau 10 : Anticorps utilisés**

**B. Purification des anticorps dirigés contre ExsB**

Afin d'améliorer leur spécificité, les anticorps dirigés contre ExsB, ont été purifiés contre la protéine pure.

*1) Purification de la protéine ExsB*

La protéine ExsB a été purifiée comme décrit à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble. La protéine ExsB portant à son domaine N-terminal les étiquettes hexa-histidine (His) et « maltose binding protein » (MBP) a été exprimée chez *E. coli Rosetta II*.

Après 3 heures d'induction à 1mM d'IPTG dans 1L de milieu, les bactéries ont été lysées par le microfluidizer M110P pendant 5 minutes à 15000 psi dans 30mL de tampon 25mM Tris, 500mM NaCl, pH8, 20 mM Hepes, 10 mM imidazole supplémenté par un cocktail d'inhibiteurs de protéases sans EDTA (Roche).

Après une ultracentrifugation de 10 minutes à 14 000g, le lysat a été appliqué à une colonne HisTrap HP de 1mL de GE Healthcare, permettant de purifier la protéine par affinité au nickel (via l'étiquette hexa histidine). Après élution à 200 mM d'imidazole, l'échantillon est dialysé pendant la nuit à 4°C contre le tampon de dialyse (NaHCO<sub>3</sub> 0,1M NaCl 0,5 M pH8).

*2) Liaison de la protéine ExsB pure à la résine CH Sepharose 4B*

15 g de résine sont resuspendus dans 50mL de HCl 1 mM, pendant 15 min à température ambiante. Plusieurs lavages sont ensuite effectués : avec 150 mL de HCl 1 mM puis avec 100 mL de tampon de dialyse.

La résine est incubée avec 2 mL de ExsB purifiée (soit 46 mg de protéines) pendant 2h à température ambiante. Cela permet la fixation de la protéine ExsB, par les groupements NH<sub>2</sub> libre, aux groupements actifs du gel.

Après un rinçage avec 50 mL de tampon dialyse, 50mL d'une solution de TrisHCl 0,1M sont incubés pendant 30min à température ambiante pour bloquer les groupements actifs de la résine n'ayant pas réagi.

Le gel est ensuite coulé dans une colonne. Deux cycles de lavage sont réalisés avec 50 mL d'acetate de sodium ; 0,1M NaCl 0,5M acide acétique 0,1M, pH4 puis avec 50mL de Tris 0,1M pH8 NaCl 0,5M.



### 3) Purification des anticorps

La colonne est chargée avec le sérum de lapin anti ExsB en continu pendant 2h, à un débit de 1mL/min. La colonne est ensuite lavée avec du PBS. L'élution est effectuée par une solution de glycine à 100mM, pH2. Le pH des fractions d'élution est neutralisé par du tampon Tris HCl à 1M, pH8.

## C. Localisation des protéines d'intérêt

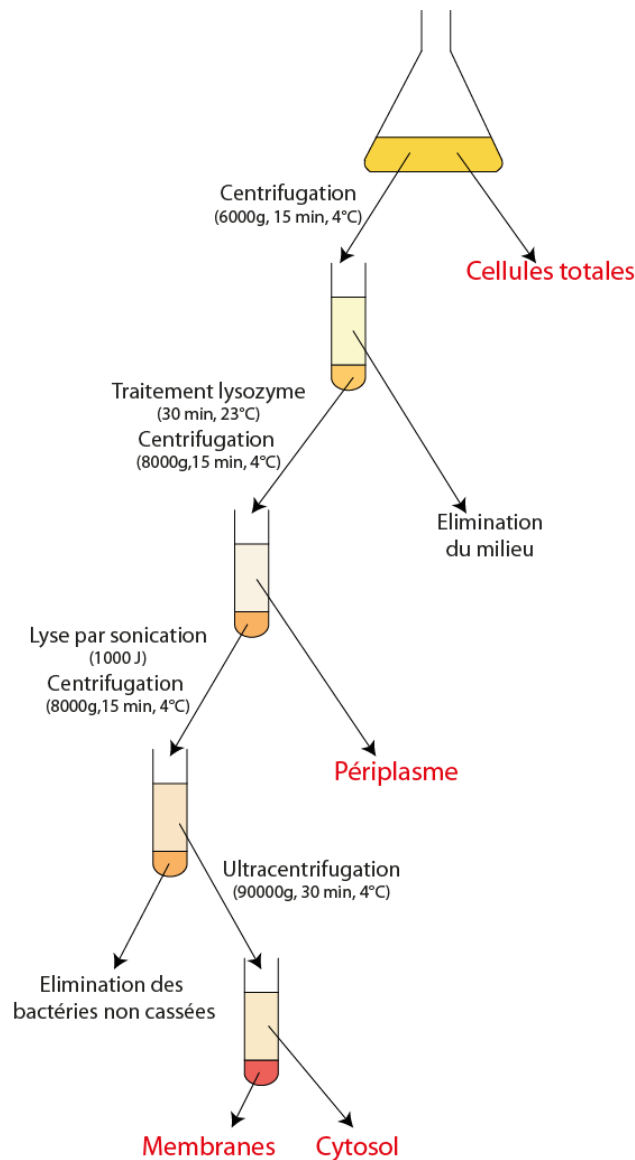
Cette partie concerne les essais de localisation des protéines du SST3 au sein de la bactérie réalisés dans le cadre de l'étude de la protéine ExsB et de son activité dans ce système. Après avoir été étudiée par fractionnement cellulaire simple, la localisation des protéines détectées dans les membranes bactériennes a été approfondie en séparant la membrane interne de la membrane externe. Enfin, des techniques de marquage fluorescent des protéines ont été utilisées afin de visualiser si la protéine ExsB et son partenaire potentiel PscC co-localisent.

### 1) Fractionnement cellulaire

La localisation des protéines d'intérêt est réalisée sur des cultures bactériennes de *P. aeruginosa* de 30 mL, en condition d'induction du SST3. Le fractionnement cellulaire est réalisé en plusieurs étapes, représentées sur la figure ci-dessous. Après avoir prélevé un échantillon de 500µL de culture à D.O.<sub>600nm</sub> 1 (**fraction Cellules Totales**), les bactéries sont culotées par centrifugation à 6000g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot bactérien est lavé avec 10 mL de tampon TM (Tris-HCl 30mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, protease inhibitor cocktail, complete, Roche) puis remis en suspension dans 1 mL de tampon TM contenant 500µg/mL de lysozyme.

Une incubation de l'échantillon pendant 30 minutes à 23°C permet au lysozyme de dégrader le peptidoglycane. L'échantillon est centrifugé à 8000g pendant 15 minutes à 4°C : le surnageant contient le **Périplasma** tandis que le culot est constitué de sphéroplastes, c'est-à-dire des bactéries « vidées » de leur périplasma (possédant seulement les membranes interne et externe). Ces sphéroplastes sont lavés avec 1 mL de tampon TM puis lysés dans 1 mL de tampon TM par sonication (appareil Vibra Cell 75185, amplification 40%) ; 1000J, par pulse de 2 fois 1 min puis 30s). Les cellules non cassées sont éliminées par centrifugation à 8000g

pendant 15 min puis les membranes sont culotées par ultracentrifugation à 90000g pendant 30 min. Le surnageant correspond au **Cytosol** tandis que les **Membranes** sont présentes dans le culot.



**Figure 29 : Principales étapes de fractionnement cellulaire pour la séparation du périplasme, du cytosol et des membranes de *P. aeruginosa***

## 2) Séparation des membranes interne et externe

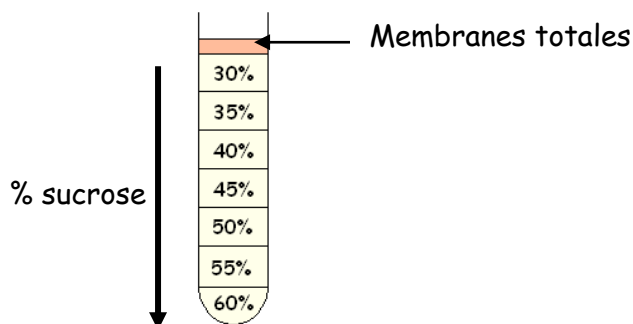
### Séparation des membranes en fonction de leur densité par gradient sucrose

Pour séparer les membranes interne et externe, les cultures bactériennes de *P. aeruginosa* sont réalisées dans 500mL de milieu LB, en condition d'induction du SST3, jusqu'à D.O.<sub>600nm</sub> 1. Après centrifugation à 6000g pendant 15 minutes à 4°C de la totalité de la culture, les bactéries sont remises en suspension dans 25 mL de tampon A (10 mM Tris, pH

7,4, 10 µg/mL de RNase, 10µg/mL DNase 20% sacharose (m/m) et une pastille d'inhibiteurs de protéase, Complete, Roche).

La **lyse des cellules** est réalisée avec le microfluidizer M-110P à 15 000 psi en continu pendant 5 minutes. Les cellules intactes non lysées sont éliminées par centrifugation à 8000g pendant 15 minutes à 4°C. Les **membranes totales** sont récupérées par **ultracentrifugation** : 1 heure à 138 000 g à 4°C puis remises en suspension dans une solution à 20% (m/m) de sacharose.

L'échantillon des membranes totales est déposé sur le dessus d'un **gradient discontinu de sacharose**, préparé à 4°C comme décrit dans le schéma ci-dessous. Pour les premières expériences de localisation de la protéine ExsB, le gradient de sacharose a été préparé en superposant 1,5 mL de chacune des solutions à 60% ; 55% ; 50% ; 45% ; 40% ; 35% et 30% de sacharose. Pour les expériences de séparation réalisées par la suite, les couches du gradient de sacharose ont été modifiées afin d'améliorer la séparation des membranes et sont composées de la façon suivante : 1,4mL à 55% ; 1,5 mL à 50% ; 1,5 mL à 45% ; 1,3 mL à 42,5% ; 1,5 mL à 40% ; 1,3 mL à 37,5 % ; 1,5 mL à 35% et 1 mL à 30%.



**Figure 30 : Composition des gradients de sacharose pour la séparation des membranes interne et externe.**

La séparation des membranes par gradient de sacharose est réalisée par ultracentrifugation à 207 000 g à 4°C pendant 72 h.

Finalement, 24 fractions de 500 µL sont collectées. Les fractions de membrane interne se trouvent au niveau de 37,5% de sacharose tandis que les fractions de membrane externe sont retrouvées au niveau de 42,5% sacharose. Chaque échantillon est dilué au ¼ dans du bleu de charge puis incubé 10 minutes à 100°C pour l'analyse SDS PAGE suivie de par coloration au bleu de Coomassie ou de Western blot. Les fractions de la membrane externe sont facilement reconnaissables via la présence de porines, bande majoritaire visualisée par coloration au bleu de Coomassie à environ 35 kDa. La protéine XcpY, contre laquelle un

Western blot peut être réalisé, est spécifiquement localisée dans la membrane interne. Le dosage de l'activité NADH oxydase permet de confirmer les fractions contenant la membrane interne.

L'activité NADH oxydase des échantillons issus des gradients de saccharose est mesurée de la façon suivante. Au temps 0, 50 $\mu$ L d'échantillon purs sont mélangés avec 10 $\mu$ L de substrat NADH à 12mM, dans 940 $\mu$ L de tampon à 50mM Tris HCL ; 0,2 mM de DTT ; pH 7,4. L'absorbance est mesurée à 340nm au début de la réaction (temps 0) et au bout de 5 min de réaction à température ambiante. La différence d'absorbance est corrélée à l'activité NADH oxydase. Les fractions de membrane interne contiennent la NADH oxydase et présentent donc une activité élevée.

#### Séparation des membranes par solubilisation différentielle par des détergents

La séparation des membranes interne et externe par solubilisation différentielle par des détergents a été décrite par (Hoang et al. 2011). Les membranes provenant de 30 mL de cultures de *P. aeruginosa*, ont été préparées comme décrit dans la partie II-C-1) mais en éliminant l'étape de traitement au lysozyme. Elles sont incubées pendant 30 minutes dans la glace dans du tampon 20mM Tris HCl, 0,2% sarkosyl, pH 7,5 afin de solubiliser les membranes internes. Après une ultracentrifugation à 200000g pendant 1h à 4°C, les membranes externes sont resuspendues dans du tampon 20mM Tris HCl, 0,1% SDS, pH 7,5.

### **D. Recherche des partenaires de la protéine ExsB**

Différentes méthodes ont été employées pour rechercher les protéines partenaires de ExsB, et en particulier pour détecter une interaction entre ExsB et son partenaire potentiel PscC.

#### *1) Pull-down*

Les 500 mL de suspension bactérienne des souches CHA  $\Delta$ exsB/exsB (utilisée comme contrôle négatif) et CHA  $\Delta$ exsB/exsBstrep à D.O. 1 et dont le SST3 a été induit sont récoltés. Après avoir resuspendu le culot dans 25 mL de tampon de lyse (50 mM Tris HCl, pH8 ; 150 mM NaCl, cocktail d'inhibiteur de protéases PIC de Roche), les bactéries sont lysées au Microfluidizer M110P à 15 000 psi pendant 5 minutes. Les bactéries non cassées sont éliminées par une centrifugation à 6000g et à 4°C pendant 15 minutes. Une ultracentrifugation à 138 000 g pendant 30 minutes à 4°C permet de récupérer les membranes bactériennes.

Après deux lavages avec 10 mL de tampon de lyse, les membranes sont solubilisées dans 9 mL d'une solution composée de 50 mM Tris HCl, pH8 ; 150 mM NaCl ; 1% DDM ; 2mM EDTA et du cocktail d'inhibiteur de protéases PIC de Roche. Une ultracentrifugation de 10 minutes à 310 000 g à 4°C est réalisée afin d'éliminer les membranes mal solubilisées. Le kit Strep tactin de Novagen est utilisé pour extraire la protéine ExsB grâce à son étiquette protéique Strep ainsi que ses partenaires potentiels. Pour cela, les billes de résine Strep Tactin, lavées au préalable avec du tampon de lavage fourni dans le kit, sont incubées pendant la nuit avec les membranes solubilisées. La fraction non fixée à la résine est récupérée par une centrifugation de 2 minutes à 200 g. Après trois lavages avec le tampon de lavage supplémenté par 0,05% de DDM, trois éluions successives sont effectuées avec le tampon d'éluion du kit contenant 0,05% de DDM. Toutes les fractions sont analysées par coloration à l'argent, Western blot et spectrométrie de masse.

## 2) Immunoprécipitation

L'immunoprécipitation est réalisée grâce au kit de Invitrogen (ref. 10006D, Immunoprecipitation kit Dynabeads protein A) en plusieurs étapes.

La première étape est la **fixation des anticorps** sur les billes magnétiques. Environ 25 µL de billes magnétiques couplées à la protéine A sont rincées avec du PBS puis incubées avec 1 mL d'anticorps purifiés dirigés contre ExsB, avec rotation, pendant 1h30. Les anticorps sont ainsi fixés aux billes, du fait de leur forte affinité avec la protéine A. Cette fixation est stabilisée par une incubation pendant 1h30 avec 250 µL de crosslinker BS3 à une concentration de 5mM dans du tampon de conjugaison (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl). La réaction de crosslink est stoppée par l'ajout de 12,5 µL de Tris HCl, pH 7,4 pendant 15 min.

L'étape suivante est l'**immunoprécipitation de l'antigène** ExsB. Les lysats bactériens sont préparés à partir de bactéries concentrées 15 fois dans du tampon de lyse (20 mM Tris HCl, pH8, 0,1 M NaCl, 2mM EDTA, 0,5% DDM et le cocktail d'inhibiteurs de protéases). Les bactéries sont cassées par sonication, 3 fois 150 J. Après élimination des bactéries non cassées par centrifugation 10 minutes à 8000g à 4°C, les lysats bactériens sont incubés pendant 3h avec les billes Dynabeads précédemment liées aux anticorps.

Enfin, après 3 lavages, ExsB et ses interactants sont élués par incubation des billes dans 20µL de tampon d'éluion. Une première **éluion** est réalisée pendant 2min à température ambiante et une seconde éluion pendant 10min à 70°C. Les échantillons sont analysés par coloration à l'argent, par Western blot et par spectrométrie de masse. Si la

protéine ExsB a bien été immunoprécipitée, elle devrait être détectée dans les fractions d'élution. Si elle interagit avec un partenaire, ce partenaire devrait être identifié dans les fractions d'élution.

### 3) *Overlay ou Far Western blot*

L'overlay est réalisé comme décrit par Hall R. A. (2004) (Hall 2004), en mettant en contact dans 9 mL de PBS tween 0,05% lait 2%, soit :

- 250  $\mu$ L de l'extrait contenant la protéine ExsB avec une membrane PVDF sur laquelle ont été transférés 12  $\mu$ L des lysats bactériens de *P. aeruginosa* CHA et CHA  $\Delta$ pscC. La membrane est alors révélée avec l'anticorps anti ExsB.
- 750 $\mu$ L de lysats bactériens de CHA et CHA  $\Delta$ pscC avec la membrane PVDF sur laquelle a été transférée 7  $\mu$ L de l'extrait contenant la protéine ExsB. La membrane est analysée avec les anticorps anti PscC.

Les lysats bactériens sont préparés à partir de 45 mL de cultures induite à l'EGTA. Après lyse des bactéries par sonication (3 fois 200J) dans 1,5 mL de PBS contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéase (PIC Complete, Roche) ainsi que du DDM à 0,05%, les bactéries non cassées ont été éliminées par centrifugation 10 min à 8000g à 4°C.

### **E. Purification de l'ATPase PscN**

L'ATPase PscN de *P. aeruginosa* a été purifiée afin de caractériser cette enzyme *in vitro*. Cette purification a été réalisée à partir de l'expression de la protéine dans son environnement naturel, c'est-à-dire dans *P. aeruginosa*. La première étape est la séparation du contenu soluble (cytosol, périplasme) et des membranes de la bactérie. Plusieurs techniques de purification par chromatographie ont ensuite été appliquées. Enfin, les échantillons purifiés ont été observés par microscopie électronique et analysés par SDS PAGE et spectrométrie de masse, afin de vérifier la pureté et de détecter des partenaires potentiels ou contaminants. L'activité ATPase de ces échantillons a également été étudiée pour vérifier que la protéine purifiée n'a pas perdu son activité.

*1) Séparation du cytosol et des membranes*

Les souches de *P. aeruginosa* exprimant l'ATPase « taggée » (hexa-histidine et/ou Strep), obtenues par complémentation de la souche  $\Delta pscN$  sont récoltées à partir de 1L de culture en conditions d'induction du SST3, à une D.O.<sub>600nm</sub> de 1.

Après centrifugation à 6000g pendant 10 min à 4°C, les culots bactériens sont remis en suspension dans 30mL de tampon de lavage contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéase Complete (Roche). Le tampon de lavage utilisé avant une chromatographie d'affinité via l'étiquette hexa-histidine est le tampon IMAC (25mM Tris, 500mM NaCl, pH8), tandis que celui utilisé avant la chromatographie d'affinité via l'étiquette Strep est le tampon S (100mM Tris, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, pH8). Une autre condition de purification a été testée dans laquelle l'échantillon est 4 fois plus dilué dans ce même tampon.

Différentes conditions de lyse des bactéries ont également été utilisées afin d'optimiser la purification.

La première est la lyse mécanique par une presse de French (3 passages à une pression de 15000 psi).

La seconde est la sonication (pulse 5 s, repos 5s pendant 20min), qui permet de casser les bactéries par des ultrasons.

La dernière repose sur l'utilisation du « microfluidizer » M-110P. Cet appareil conduit à une lyse mécanique par pression et par cisaillement. Les conditions d'utilisation du « microfluidizer » ont été optimisées par Amandine Gaude.

Les meilleures conditions sont obtenues lorsque la suspension bactérienne est appliquée en continu dans le « microfluidizer » pendant 5 min à 10 000 p.s.i.

Pour la purification de l'ATPase, les fractions solubles mais aussi les fractions membranaires peuvent être utilisées. Les membranes sont séparées du contenu soluble par ultracentrifugation à 125 000 g pendant 45min à 4°C. Les fractions membranaires sont préparées en solubilisant un culot de membranes provenant de 15 mL de suspension bactérienne dans 15 mL de tampon de lavage + 1% triton X100 à 4°C pendant 14h. Les membranes non solubilisées sont éliminées par ultracentrifugation à 125 000 g pendant 1h30 à 4°C.

Enfin, l'ATPase contenue soit dans la fraction soluble soit dans les membranes est purifiée par des méthodes chromatographiques FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). Toutes les chromatographies sont réalisées à l'aide d'un appareil de chromatographie liquide « Akta purifier ».

### 2) *Purification primaire par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel*

La chromatographie d'affinité sur colonne de nickel repose sur l'interaction entre le nickel présent sur la colonne et les six histidines de l'étiquette protéique portée par la protéine d'intérêt. La colonne utilisée, la His Trap, a un volume de 1mL.

Après avoir fixé le nickel sur la colonne avec une solution à 0,5M de NiSO<sub>4</sub> à pH8, et équilibré la colonne dans du tampon IMAC, l'échantillon est chargé à un débit de 1mL/min, à l'aide d'une pompe péristaltique. La colonne est ensuite placée sur l'« Akta purifier ». Pour toute la purification, un débit de 1mL/min est utilisé. Plusieurs étapes de lavage sont effectuées avec des concentrations croissantes en imidazole pour éluer les contaminants qui auraient pu se lier à la colonne :

Un lavage avec 10 mL de tampon IMAC contenant 20mM imidazole.

Un lavage avec 10 mL de tampon IMAC contenant 50 mM imidazole.

Un lavage avec 10 mL de tampon IMAC contenant 100 mM imidazole.

Pour l'élution 20 mL de tampon IMAC contenant 200 mM imidazole sont appliqués, et des fractions de 2 mL sont récoltées.

Un tampon phosphate NaCl peut également être utilisé à la place du tampon IMAC.

La colonne est régénérée par passage d'EGTA à 0,5M, qui est un agent chélateur de nickel.

### 3) *Purification primaire par chromatographie d'affinité sur colonne Streptactine*

L'échantillon issu des cultures de *P. aeruginosa* exprimant l'ATPase fusionnée à une étiquette protéique Strep est appliqué à une colonne Strep Trap de 1mL, équilibrée au préalable dans du tampon S. Différentes conditions de fixation de la protéine ont été testées : 2 passages de l'échantillon sur la colonne, passage en continu pendant 14h à 4°C, passage de 10mL seulement, à des débits de 1 ou 0,7 mL/min.

La purification a ensuite été effectuée à un débit de 1mL/min. Tout d'abord, la colonne a été lavée avec 10mL de tampon S. Puis, 8mL de tampon S supplémenté par 2,5mM de desthiobiotine ont été utilisés pour éluer la protéine. Des fractions de 1mL sont récoltées pendant cette étape d'élution. Lorsque cette purification d'affinité est réalisée à partir des échantillons membranaires, tous les tampons sont supplémentés par 0,1% de triton X100.

La colonne est régénérée en appliquant du tampon S contenant 1mM HABA (acide 2-[4'hydroxy-benzeneazo] benzoïque). Cette technique peut être utilisée en tant qu'étape de purification secondaire, après la chromatographie d'affinité sur colonne de nickel.



*4) Purification secondaire après la chromatographie d'affinité sur colonne de nickel*

Une étape de purification secondaire peut être effectuée afin d'améliorer la pureté des échantillons. L'échantillon à purifier est constitué d'un pool de fractions d'élution issu de purifications par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel. Cette deuxième purification est soit une chromatographie d'échange d'ions soit une chromatographie d'interaction hydrophobe. Lorsque l'ATPase possède une double étiquette protéique (Histidine et Strep), la purification secondaire peut consister en une nouvelle chromatographie d'affinité sur colonne Streptactine, effectuée dans les conditions décrites précédemment.

Chromatographie d'échange d'ions

Une étape d'élimination du sel présent dans l'échantillon est tout d'abord nécessaire pour permettre la fixation des protéines sur la colonne. Pour cela, l'échantillon est chargé sur une colonne d'exclusion de taille HiPrep 26/10, qui permet de retenir le sel et l'imidazole tout en excluant les protéines de plus de 5000 Da. Le tampon utilisé lors de cette étape est du Tris-HCl à pH8. La fraction correspondant aux protéines exclues de la matrice, contenant l'ATPase, est récoltée dans le tampon Tris-HCl à pH8.

Le point isoélectrique de l'ATPase étant de 6,85, la protéine est chargée négativement dans le tampon Tris-HCl à pH8. La fraction contenant l'ATPase est donc appliquée à une colonne échangeuse d'anions, une HitrapQ HP de 1mL. La chromatographie s'effectue à un débit de 1mL/min et consiste en une étape de lavage avec 8 mL de tampon Tris-HCl à pH8 puis un gradient de 20mL jusqu'à une concentration en sel NaCl de 1M et enfin une élution avec 20mL de tampon Tris-HCl à pH8 contenant 1M de NaCl.

Chromatographie d'interaction hydrophobe

L'étape de changement de tampon est réalisée avec la colonne Hi Prep 26/10 de 1mL en utilisant le tampon Tris-HCl, 2M NaCl, pH8.

L'échantillon est ensuite injecté dans une colonne HiTrap phenyl HP. Après un lavage avec 8 mL de tampon Tris-HCl, pH8, 2M NaCl, un gradient décroissant en concentration en sel NaCl est appliqué pendant 20mL. L'élution est finalement effectuée par 20mL de Tris-HCl, pH8. Les protéines qui auraient pu rester liées à la colonne sont éluées par injection d'éthanol à 20%.

5) *Purification secondaire après la chromatographie d'affinité sur colonne Streptactine*

Les échantillons semi-purs obtenus après la chromatographie d'affinité sur colonne Streptactine ont été séparés par chromatographie d'exclusion de taille. Pour cela, la colonne Superdex 200, permettant la séparation des protéines dont le poids moléculaire est compris entre 10 et 600 kDa, a été utilisée. Le débit appliqué à la colonne a été de 1mL/min.

**F. Analyse par spectrométrie de masse des protéines présentes dans différents échantillons**

Cette analyse a été réalisée par Yohann Coute et Alexandra Kraut, de l'équipe Edyp, du laboratoire Biologie à Grande Echelle du CEA de Grenoble, par chromatographie liquide avec détection par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Cette technique repose sur l'analyse des peptides résultant de la digestion des protéines contenues dans l'échantillon.

Elle a été utilisée pour déterminer les protéines présentes dans les échantillons de PscN partiellement purifiée ainsi que dans les échantillons issus des immunoprécipitations de ExsB.

**G. Tests activité ATPase**

Les tests d'activité ATPase ont été réalisés afin de vérifier la fonctionnalité de l'ATPase PscN, notamment dans les échantillons partiellement purifiés.

L'activité ATPase a été évaluée en dosant le phosphate libéré lors de l'hydrolyse de l'ATP. Les conditions de réaction sont l'incubation de 70µL d'échantillon avec 10 µL d'ATP MgCl<sub>2</sub> 5mM et 20µL de Tris-HCl 30 mM pH7,5 pendant 1h ou 1h30 à 37°C. 800µL de réactif de coloration (malachite green 0,034%, Molybdate d'ammonium 1% (m/v), Triton X100 0,005%, incubation 30 min à température ambiante) sont ensuite ajoutés. Après incubation 1 min, l'absorbance est mesurée à 640nm.

***IV. Etude de l'activation et de l'activité du SST3***

Différentes méthodologies ont été appliquées pour étudier l'activation et l'activité du SST3 dans les différentes souches de *P. aeruginosa*, en particulier pour les souches

délétées des gènes codant pour les protéines PscN et ExsB ainsi que les souches complémentées correspondantes. Les trois premiers tests décrits dans cette partie sont réalisés *in vitro* sur des cultures bactériennes, pour mesurer l'activation de la transcription des gènes du SST3, vérifier l'expression et la sécrétion de protéines de ce système et compter le nombre d'aiguilles du SST3 assemblées par les bactéries. Les paragraphes suivants expliquent les techniques utilisées pour rendre compte de l'activité du SST3 envers des cellules ou organismes eucaryotes.

### A. Test d'activation du SST3

Ce système a été mis au point au laboratoire par Mayebine Sall et a été appliqué pour toutes les souches de *P. aeruginosa* délétées d'un gène du SST3 disponibles au laboratoire. Les souches dont l'activation du SST3 doit être étudiée sont transformées par le plasmide pS GFP. Ce plasmide permet d'exprimer la GFP lorsque le promoteur pS, promoteur du gène codant pour la toxine ExoS du SST3, est activé. Ainsi, la fluorescence émise par les bactéries est directement liée à l'activation du SST3.

Les souches transformées, après avoir été cultivées pendant 15h à 300 RPM et 37°C, sont diluées à D.O.<sub>600nm</sub> 0,1 dans 100µL de milieu dans une plaque stérile.

Le milieu peut être du LB seul ou bien de LB supplémenté avec 5mM de CaCl<sub>2</sub> (répression du SST3) ou bien avec 5mM d'EGTA et 20mM de MgCl<sub>2</sub> (activation du SST3).

La fluorescence des bactéries est suivie pendant 6h à une longueur d'onde d'excitation de 485nm et d'émission de 527 nm dans un fluorimètre en plaque (Thermo).

Des cinétiques reflétant la fluorescence du promoteur pS GFP en fonction du temps ont été tracées. Les pentes des zones linéaires de ces cinétiques sont corrélées à l'activation du promoteur pS GFP.

### B. Tests d'expression et de sécrétion de protéines du SST3

Lorsqu'une D.O.<sub>600nm</sub> de 1 est atteinte après induction du SST3, 1mL de culture de *P. aeruginosa* est centrifugé à 13 000 g pendant 5 minutes. La présence d'effecteurs ou de translocateurs sécrétés dans le milieu extracellulaire est analysée par Western blot sur le surnageant ou bien directement par une coloration à l'argent du gel d'électrophorèse du

surageant. Un autre Western blot sur la fraction cellulaire permet de vérifier la production des protéines du SST3 par les bactéries, ainsi que leur niveau d'expression.

### C. Modèles d'infection *in vitro*

Des modèles d'infection *in vitro* ont été utilisés dans le but d'évaluer l'implication des protéines PscN et ExsB dans la cytotoxicité due au SST3 envers les cellules eucaryotes. Pour cela, des infections par *P. aeruginosa* ont été réalisées sur des cultures de différentes cellules eucaryotes.

#### 1) Relargage de la Lactate Déshydrogénase (LDH) par les macrophages de souris J774

L'activité du SST3 lors de l'infection par *P. aeruginosa* provoque la lyse des macrophages. La LDH intracellulaire fuit à l'extérieur des cellules et peut être dosée par un test enzymatique. Le pourcentage de LDH expulsée entre 1 heure et 4 heures après l'infection est donc corrélé avec la cytotoxicité dépendant du SST3 du pathogène. Ce test a été utilisé pour rendre compte de la cytotoxicité causée par les différentes souches de *P. aeruginosa* construites pour l'étude de l'ATPase PscN et de la protéine ExsB de ce système

Pour permettre leur adhérence, 200µL de cellules J774 à une concentration de  $10^6$  cellules/mL sont déposées dans chaque puits la veille de l'infection, dans une plaque 48 puits. Le jour de l'infection, les bactéries à D.O.  $_{600nm}$  1 sont diluées dans du LB préchauffé à 37°C de sorte à infecter les cellules avec 5µL de suspension bactérienne. Le rapport entre le nombre de bactéries utilisé pour l'infection et le nombre de cellules, appelé MOI (Multiplicity Of Infection) peut être de 0,2 ; 1 ; 5 ou 10, sachant que 1 mL de bactéries à D.O.  $_{600nm}$  1 correspond à  $6.10^8$  bactéries. Les macrophages sont lavés avec du milieu chaud sans antibiotique 1 heure avant l'infection.

Au bout de 1h, 2h, 3h et éventuellement 4h d'infection à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 30 µL de surnageant d'infection sont prélevés. Le dosage enzymatique est réalisé grâce au kit « Cytotoxicity Detection (LDH) » de Roche. 100µL de réactif sont ajoutés à chaque échantillon, et l'activité est mesurée via la mesure de la D.O. à 492 nm après 5 min de réaction à l'obscurité. Le témoin négatif (cellules seules, non infectées) correspond au 0% de cytotoxicité tandis que le témoin positif (cellules seules lysées par du triton X100 1%) correspond au 100% de cytotoxicité.

### 2) Arrondissement cellules épithéliales A549

Cet autre test de cytotoxicité a été effectué pour confirmer les résultats observés sur les macrophages de souris sur une autre lignée cellulaire. Les effecteurs sécrétés par le SST3 *P. aeruginosa* conduisent à un réarrangement du cytosquelette d'actine des cellules infectées et à leur arrondissement. Les cellules sont marquées avant l'infection avec des colorants vitaux du noyau (Hoechst 33258) et de la surface cellulaire (Dii). Le système automatisé InCell d'acquisition et d'analyse d'images de microscopie à fluorescence du centre de Criblage pour Molécules BioActives (CMBA) est utilisé. Les cellules épithéliales A549 sont classées selon leur forme, « ronde » ou « étalée » en fonction de leur forme et de leur rapport noyau/cytoplasme, à différents temps après l'infection. Les pourcentages de cellules arrondies sont déterminés toutes les heures entre 1 heure et 4 heures après l'infection.

### 3) Rétraction des cellules endothéliales HUVEC

Ce dernier test de cytotoxicité, développé dans l'équipe par Philippe Huber et Stéphanie Bouillot, a été réalisé sur des cellules endothéliales primaires et non pas sur une lignée cellulaire immortalisée. Ce type de cellules est donc plus proche des cellules infectées *in vivo*. Ces cellules se rétractent rapidement lorsqu'elles sont infectées par des souches de *P. aeruginosa* ayant un SST3 actif. Les cellules sont isolées à partir de cordons ombilicaux humains par une technique pré-établie. Après trois heures d'infection, les cellules sont fixées au méthanol froid et marquées avec un anticorps dirigé contre la  $\beta$ -actine. La révélation avec un anticorps secondaire fluorescent permet de visualiser l'ensemble du corps cellulaire. Trois images sont prises pour chaque condition et la surface cellulaire est mesurée pour chaque champ à l'aide du logiciel ImageJ. Le pourcentage moyen de rétraction cellulaire provoqué par les différentes souches de *P. aeruginosa* est calculé à partir des mesures des surfaces cellulaires.

## D. Modèles d'infection *in vivo*

Des infections aiguës ont été réalisées *in vivo* sur des animaux, la drosophile et la souris pour étudier l'implication de la protéine ExsB dans la virulence de *P. aeruginosa*. Ces animaux sont des modèles usuellement utilisés pour étudier l'impact de facteurs de virulence lors d'infections (Rahme et al. 2000).

### 1) Infections de drosophiles

Les drosophiles constituent un bon modèle d'infection car elles possèdent un système immunitaire inné proche de celui des mammifères (D'Argenio et al. 2001). Les expériences d'infection de drosophiles ont été réalisées en collaboration avec Marie-Odile Fauvarque et Perrine Viargues, de l'équipe « Génétique & chimogénomique » du laboratoire Biologie à Grande Echelle du CEA de Grenoble. Les cultures de *P. aeruginosa* en phase exponentielle sont diluées à D.O.<sub>600nm</sub> 0,35. Les mouches sont endormies au CO<sub>2</sub> puis piquées par ces cultures, sous l'aile. Le suivi de la mortalité des drosophiles entre 1 heure et 24 heures après la piqûre reflète la virulence des différentes souches.

### 2) Infections aiguës des poumons chez la souris

Des infections aiguës chez les souris ont été réalisées par Philippe Huber et Stéphanie Bouillot pour étudier le rôle de ExsB dans la virulence de *P. aeruginosa*. Pour chaque souche bactérienne testée, dix souris mâles BALB/c de 20g (provenant de l'élevage Harlan) ont été infectées par inhalation de  $2.10^6$  bactéries afin de déclencher une pneumopathie. Ce modèle est intéressant puisque *P. aeruginosa* infecte souvent les poumons des personnes fragilisées. Les souris ont été traitées en accord avec la législation française dans un protocole agréé par le comité d'éthique de l'animalerie (CETEA, avis 1201). La survie des animaux a été suivie toutes les deux heures. Des courbes de Kaplan-Meyer ont été établies et le test statistique Log rank a été appliqué afin d'établir la significativité des différences entre les courbes.

## E. Taux d'injection de la toxine ExoS-β-lactamase dans des cellules eucaryotes

Le taux d'injection de la toxine ExoS- β-lactamase dans le cytoplasme de différentes cellules eucaryotes par *P. aeruginosa* a été mesuré pour étudier l'implication de ExsB dans l'injection de toxines par le SST3. Ces tests ont également été réalisés pour une autre toxine chimérique, ExoY- β-lactamase (Verove et al. 2012).

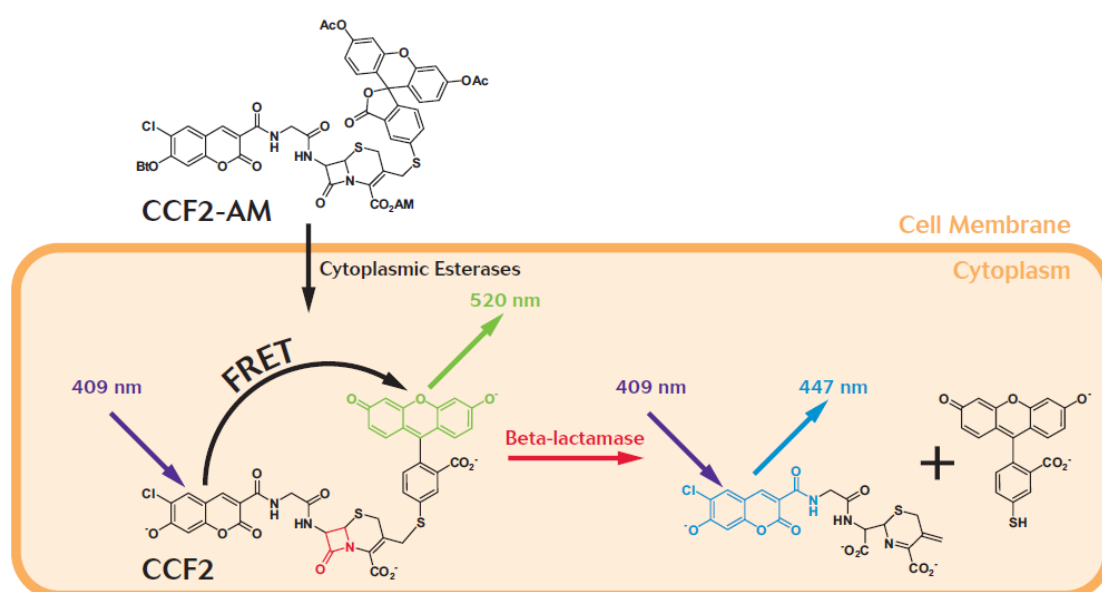
### 1) Dans les cellules BJAB

Les cellules BJAB sont réparties dans une plaque 48 puits en déposant 200μL de suspension par puits à  $10^6$  cellules/mL. Les bactéries produisant la toxine chimérique ExoS fusionnée à la β-lactamase (notée ExoS-bla) par expression plasmidique sont cultivées jusqu'à une D.O.<sub>600nm</sub> de 1 puis diluées dans du LB préchauffé à 37°C de sorte à infecter les cellules

avec 5  $\mu$ L de suspension bactérienne a une MOI de 0,2 ; 1 ; 5 ou 10. L'infection se déroule à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> pendant 3h30.

40  $\mu$ L de la solution de CCF2-AM (Invitrogen) sont ajoutés dans chaque puits, suivis d'une incubation 30 min à température ambiante. Après lavage dans 10mL de PBS + 2% penicilline/streptomycine, les cellules sont resuspendues dans 400  $\mu$ L de PBS + 2% penicilline/streptomycine et analysée en FACS avec Véronique Collin.

Les cellules qui n'ont pas été injectées ne possèdent pas de  $\beta$ -lactamase, et le CCF2 émet une fluorescence verte. Par contre, si la toxine chimérique ExoS-bla est présente à l'intérieur des cellules injectées, la  $\beta$ -lactamase clive alors le CCF2 ce qui conduit à une émission de fluorescence bleue.



**Figure 31 : Principe de l'émission de fluorescence par le CCF2 dans le cytoplasme des cellules eucaryotes (Invitrogen)**

## 2) Dans les cellules A549

Les conditions d'infections sont les mêmes que pour le taux d'injection de la toxine ExoS bla dans les cellules BJAB hormis l'utilisation d'un milieu de culture RPMI blanc. Après 3h30 d'infection, le surnageant est éliminé et 50  $\mu$ L de CCF2 est ajouté dans chaque puits. Les fluorescences verte et bleue sont mesurées à des longueurs d'onde d'excitation de 405 nm et d'émission de 538 et 460 nm respectivement toutes les 5 min pendant 90 min sur le fluorimètre en plaques (Thermo).

#### **F. Etude de la polarisation de l'injection : quantification de la toxine chimérique ExoS bla sécrétée dans le milieu extracellulaire lors d'infections**

Pour étudier l'implication de la protéine ExsB dans l'injection de toxines par le SST3, la polarisation de l'injection a été étudiée. Une injection polarisée correspond à une injection directe des effecteurs dans le cytoplasme de la cellule cible, sans aucune fuite d'effeteur dans le milieu extracellulaire. Au contraire, une injection non polarisée conduit à la sécrétion des effecteurs à la fois dans le milieu extracellulaire et dans le cytoplasme de la cellule hôte.

Dans chaque puits d'une plaque 48 puits, 500 000 cellules eucaryotes CHO sont infectées par les bactéries exprimant ExoS-bla à une multiplicité d'infection de 5. Après 3 h d'infection, les surnageants sont prélevés et centrifugés afin d'éliminer les bactéries. Le dosage de la toxine chimérique repose sur la détection de son activité  $\beta$ -lactamase par l'utilisation d'un substrat coloré en jaune : la nitrocéfine. Pour cela, 40 $\mu$ L de nitrocéfine à 500 $\mu$ g/mL sont ajoutés à 1mL de surnageant. En présence de ExoS-bla, la nitrocéfine est transformée en un produit de couleur rouge car la partie  $\beta$ -lactamase de la toxine chimérique hydrolyse la liaison amide de son anneau  $\beta$ -lactame. L'absorbance est suivie à 486nm après 5min de réaction à température ambiante.

### ***V. Observations microscopiques des échantillons biologiques***

#### **A. Observation par microscopie électronique de PscN partiellement purifiée**

Les échantillons obtenus après la chromatographie d'exclusion de taille ont été visualisés par microscopie électronique avec Daphna Flenel, à l'IBS. L'analyse des échantillons de PscN partiellement purifiée permettent d'évaluer la pureté de la préparation. La technique de flottaison du carbone a été utilisée et les échantillons colorés négativement à l'acétate d'uranyle 2%. Les observations ont été effectuées sur le microscope Phillips CM12.

#### **B. Comptage du nombre d'aiguilles**

Cette expérience a été réalisée en collaboration avec Ariel Blocker, du laboratoire « Infection and Immunity » de l'université de Bristol, en Angleterre, pour étudier le rôle de la protéine ExsB sur l'assemblage du SST3.



Les bactéries cultivées dans des conditions d'induction du SST3 sont récoltées à D.O.<sub>600nm</sub> 1 et concentrées 10 fois dans du PBS. Ces préparations sont observées directement au microscope électronique FEI Tecnai 12, par coloration négative à l'acétate d'uranyle 1%.

Pour chaque souche, 60 clichés sont analysés pour le dénombrement des aiguilles du SST3. L'identification de ces aiguilles se fait en fonction de leur longueur de 80nm environ et de leur diamètre de 6-7nm. Seuls les objets identifiés sans aucun doute comme des aiguilles du SST3 car leur forme est clairement visible sont comptés.

L'analyse statistique des résultats est ensuite réalisée par le test par rang de Mann-Whitney, plus adapté aux petits échantillons.

### C. Immunomarquage

L'immunomarquage permet de visualiser une protéine d'intérêt par fluorescence grâce à l'utilisation d'un anticorps primaire dirigé contre la protéine et d'un anticorps secondaire couplé à une molécule fluorescente. De nombreuses conditions ont été testées pour optimiser ce protocole.

Cet immunomarquage nécessite l'activation du SST3 : ce dernier est donc induit dans des cultures de 3 mL de *Pseudomonas aeruginosa*. L'immunomarquage peut être réalisé soit en milieu liquide, soit sur lame.

#### 1) Fixation et perméabilisation des bactéries

Lorsque la manipulation est effectuée en milieu liquide, 1mL de suspension bactérienne à D.O.<sub>600nm</sub> 1 est centrifugé à 14000 g pendant 5min à 4 °C puis lavé trois fois avec du tampon PBS tween 0,1%. Ces conditions de centrifugation sont utilisées pour toutes les étapes. Une étape de **fixation** des bactéries par 500µL de para-formaldéhyde (PFA) 4% permet de « figer » les protéines des bactéries en formant des liaisons intermoléculaires (Kiernan 2000).

Cette étape est suivie par la **perméabilisation** des bactéries par 400 µL de triton X100 à 0,5% pendant 5 min puis par 25 min d'incubation dans du triton X100 à 0,5% et PFA 4%.

Lorsque l'immunomarquage est réalisé sur lame, 50µL de suspension bactérienne sont ajoutés dans 300 µL de milieu EBM2 par puits. Les lames utilisées sont des lames Labtek en verre 354118, ou des lames Labtek en plastique 177445. Différentes conditions de fixation des bactéries ont été testées : pré-traitement de la plaque à la poly-L-lysine, utilisation de PFA

4% ou de méthanol, fixation directe (ajout de PFA concentré directement dans les puits contenant les bactéries dans le milieu EBM2) ou indirecte (après lavage). De même, différentes durées de perméabilisation au triton X100 0,5% ont été appliquées : 30 min, 1h, 2h ou sur la nuit.

## 2) Marquage des bactéries et observation au microscope

Après 3 lavages au PBS-tween 0,1%, l'étape de **saturation** dans du PBS-BSA (Bovine Serum Albumin) 2% permet de limiter les signaux non spécifiques.

Les bactéries sont ensuite incubées pendant 2h30 à 4°C dans l'**anticorps primaire** dirigé contre les protéines ExsB ou PscC. Plusieurs anticorps primaires peuvent être utilisés simultanément, s'ils proviennent d'espèces différentes (lapin et cochon d'inde).

Anticorps primaire		
Cible	Espèce	Dilution dans du PBS-BSA 2%
ExsB	Lapin	1/50
PscC	Cochon d'inde	1/50

**Tableau 11 : Conditions d'utilisation des anticorps primaires pour l'immuno-marquage de protéines spécifiques chez les bactéries**

Afin d'améliorer le signal en éliminant les anticorps non spécifiques, les anticorps peuvent être au préalable purifiés par épuisement par différentes méthodes :

- soit par incubation sur des membranes de nitrocellulose ; la protéine d'intérêt ayant été transférée au préalable sur la membrane
- soit par incubation avec une poudre séchée à l'acétone de *P. aeruginosa* déletée de la protéine d'intérêt
- soit par passage sur colonne, comme décrit dans la partie III-B.

Trois lavages au PBS-BSA 2% sont réalisés avant d'incuber les bactéries pendant 1h dans la glace et dans l'obscurité avec l'**anticorps secondaire couplé à un fluorochrome**. Les anticorps secondaires utilisés sont dirigés contre les IgG de lapin ou de cochon d'inde. L'utilisation du marqueur d'ADN, le Hoechst 33258, à une concentration de 1µg/mL dans du PBS-BSA 2% permet de marquer le cytosol des bactéries en bleu.

Anticorps secondaire		
Cible	Fluorochrome (couleur)	Dilution dans du PBS-BSA 2%
IgG Lapin	Alexa 488 (vert)	1/500
IgG Cochon d'inde	Cy3 (rouge)	1/500

**Tableau 12 : Conditions d'utilisation des anticorps secondaires pour l'immunomarquage**

Enfin, après 3 derniers lavages au PBS-tween 0,1%, les bactéries sont remises en suspension si besoin dans 70 µL de PBS-tween 0,1% et montées sur des lames avec une goutte de réactif Fluorsafe. Les préparations sont analysées au microscope à épifluorescence à immersion (grossissement x100).

**D. Observation des bactéries exprimant les protéines ExsB et PscC fusionnées aux étiquettes fluorescentes mCherry et sfGFP**

Après avoir induit l'expression des protéines chimériques ExsB-mCherry et PscC-sfGFP par 0,2 % d'arabinose, les bactéries sont immobilisées sur lame par de l'agarose 1%. Les préparations sont observées au microscope à épifluorescence à immersion (grossissement x100)

# **Chapitre III :** **Résultats et** **discussion**



Dans ce chapitre, je décrirai et discuterai les résultats obtenus lors de l'étude des deux protéines du SST3 de *P. aeruginosa*, l'ATPase PscN et la protéine ExsB.

Les expériences montrant l'implication de PscN dans le SST3 ainsi que les essais conduisant à une purification partielle de cette enzyme permettront d'ouvrir de nombreuses perspectives, à la fois pour une meilleure compréhension des différents rôles de PscN envers ses partenaires du SST3 et pour des applications thérapeutiques.

La caractérisation complète de la protéine ExsB, de sa localisation à son rôle moléculaire dans la mise en place du SST3 en passant par son implication dans la virulence de *P. aeruginosa* et dans l'activité du SST3 permettra de dévoiler une partie du mécanisme d'assemblage de cette machinerie.

### ***I. Etude de l'ATPase PscN du SST3 de P. aeruginosa***

Composant indispensable à l'activité du SST3, l'ATPase est très conservée parmi les bactéries possédant cette machinerie. Elle s'assemble généralement en hexamère ou dodécamère et son activité enzymatique est nécessaire au fonctionnement du SST3. Le rôle moléculaire de l'ATPase du SST3 est encore mal défini. Elle pourrait avoir un rôle vis-à-vis des substrats du SST3, c'est-à-dire vis-à-vis des protéines sécrétées par le SST3, telles que la protéine de l'aiguille PscF, les protéines du pore PopB et PopD, ou encore les effecteurs injectés dans le cytoplasme de la cellule cible. En effet, avant leur sécrétion, les substrats du SST3 sont sous forme repliée ou partiellement repliée et sont associés à des chaperonnes cytoplasmiques. La sécrétion de ces protéines nécessite donc de séparer les substrats de leurs chaperonnes et de les déplier partiellement pour qu'ils puissent être transportés à travers l'étroite aiguille d'environ 2,7 nm de diamètre interne du SST3. Ces étapes nécessitent un apport d'énergie et pourraient donc être accomplies par l'ATPase PscN. Chez le SST3 de *Salmonella enterica*, l'ATPase est en effet capable de dissocier un complexe effecteur-chaperonne et déplier l'effecteur, ce qui appuie le rôle hypothétique de PscN (Akeda et al. 2005). De même, la dissociation d'un complexe chaperonne-effecteur a été observée chez le SST3 du phytopathogène *Xanthomonas campestris* (Lorenz et al. 2009).

Dans le but de caractériser l'ATPase PscN du SST3 de *P. aeruginosa*, des études ont été menées par des approches *in vivo* et *in vitro*. Dans un premier temps, une souche de *P. aeruginosa* dépourvue de *pscN* a été construite et caractérisée. Des mutations ponctuelles ont également été introduites dans PscN chez *P. aeruginosa*, et le phénotype correspondant a été

analysé. Pour une caractérisation fonctionnelle plus approfondie de cette enzyme, des essais de purification de la protéine PscN ont ensuite été réalisés.

### A. Implication de l'activité de l'ATPase PscN dans le SST3

Afin d'étudier la fonctionnalité de l'ATPase PscN dans *P. aeruginosa*, une souche mutante délétée d'une partie de la séquence du gène *pscN*, appelée  $\Delta pscN$ , a été créée et caractérisée. Elle est incapable de produire l'ATPase PscN et de sécréter les substrats du SST3. Afin de confirmer que le phénotype observé est dû à l'absence de PscN, le mutant a été complété par un plasmide portant le gène *pscN* soit sauvage soit muté, fusionné en N terminal avec une étiquette hexa-histidine. Les versions de *pscN* mutées ont été obtenues par mutagenèse dirigée afin de modifier des acides aminés qui pourraient être importants pour l'activité de PscN. Ces souches, utilisées comme contrôle négatif, sont indispensables pour l'étude du rôle de l'ATPase. Elles pourraient aussi permettre de capturer les protéines interagissant avec PscN, qui seraient bloquées dans cette conformation dans l'attente de la réaction enzymatique.

#### 1) Choix des acides aminés à muter

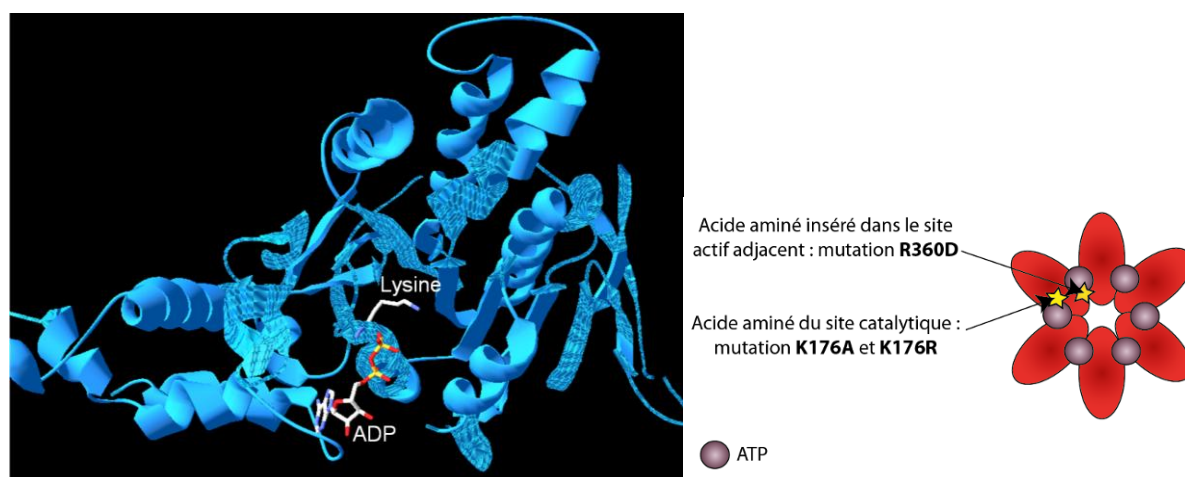
Les ATPases des SST3 étant très conservées, les acides aminés impliqués dans l'activité enzymatique pourraient également être similaires d'une espèce à l'autre. Elles possèdent notamment deux séquences consensus d'acides aminés, appelées Walker A et Walker B, impliquées dans la liaison de l'ATP à l'enzyme et dans l'hydrolyse de l'ATP respectivement (Wiese et al. 2006 ; Gomez et al. 2002).

Chez les ATPases HrcN de *X. campestris*, EscN de *EPEC* et InvC de *S. enterica*, des mutations ponctuelles au niveau de la séquence consensus Walker A provoquent une perte de l'activité ATPase (Lorenz et al. 2009 ; Zarivach et al. 2007 ; Akeda et al. 2004). De plus, la modification de l'arginine 366 en acide aspartique chez EscN conduit également à une perte d'activité car cet acide aminé s'imbrique dans le site catalytique de la sous-unité adjacente (Zarivach et al. 2007).

Un alignement de séquences des différentes ATPases a permis d'identifier les résidus d'intérêt dans la séquence de PscN. Comme représenté sur la figure suivante (Figure 32), le modèle de la structure de PscN, obtenu par le logiciel SwissModel, montre la localisation de la lysine 176 du site Walker A par rapport au site de liaison de l'ATP.

Le remplacement de cette lysine, chargée positivement, par l'arginine, chargée positivement également mais dont la chaîne est légèrement plus longue, pourrait donc gêner le placement de l'ATP dans le site actif de l'enzyme. Même si cette mutation est mineure, elle a conduit à une ATPase inactive chez le SST3 de *S. enterica* (Akeda et al. 2004). De même, la modification de cette lysine par un acide aminé plus petit et de charge neutre, comme l'alanine, est une mutation plus drastique qui pourrait perturber la liaison de l'ATP à l'enzyme. C'est pourquoi les deux mutations K176A et K176R ont été réalisées.

Par homologie avec l'ATPase EscN de *EPEC*, l'arginine 360 pourrait être imbriquée dans le site catalytique de la sous-unité adjacente (Figure 32). En plus des modifications dans le site catalytique de l'ATPase, cette arginine 360 a été mutée en acide aspartique, un acide aminé plus court et avec une charge opposée (R360D).



**Figure 32 : Mutations réalisées sur l'ATPase PscN**

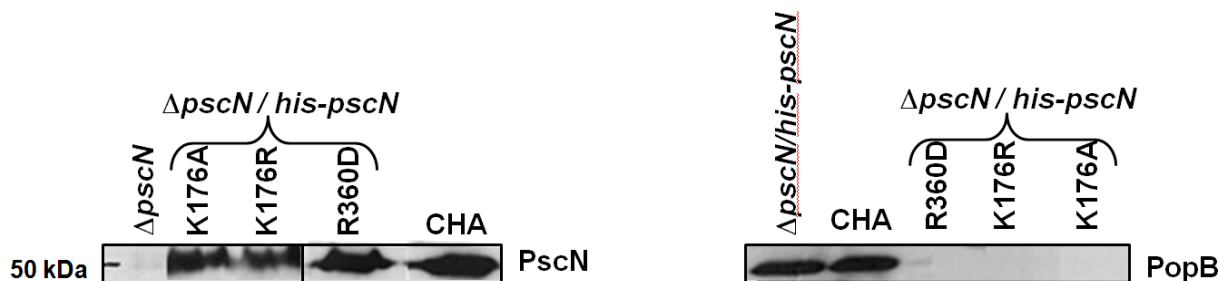
- a) Structure du site actif de l'ATPase PscN modélisée par Eric Faudry sur le logiciel SwissModel à partir de l'ATPase EscN de EPEC. PscN est représentée par le ruban bleu, la lysine du site actif ainsi que l'ADP (ligand de l'ATPase) sont représentés par leurs formules chimiques**  
**b) Schéma d'un hexamère d'ATPase PscN et les mutations introduites**

Un plasmide portant le gène codant pour l'ATPase PscN fusionnée avec six histidines en N-terminal a été utilisé pour construire trois nouveaux plasmides pour l'expression de cette ATPase mutée. Des mutations ponctuelles sur *pscN*: K176A, K176R ou R360D ont été introduites dans chacun de ces trois nouveaux plasmides. Le plasmide de départ, portant l'ATPase sauvage avec son étiquette hexa-histidine, a été utilisé en tant que contrôle positif pour toute l'étude. Les plasmides portant les différentes formes de l'ATPase ont ensuite été introduits dans une souche de *P. aeruginosa* délétée du gène *pscN*. Les souches ainsi obtenues sont notées  $\Delta pscN/his-pscN$ ,  $\Delta pscN/his-pscN_{K176A}$ ,  $\Delta pscN/his-pscN_{K176R}$ ,  $\Delta pscN/his-pscN_{R360D}$ .



2) *Activité du SST3 des souches possédant l'ATPase mutée*

Après s'être assuré de l'expression de l'ATPase mutée par les différentes souches de *P. aeruginosa* (Figure 33a), leur capacité à sécréter un substrat du SST3, la protéine du pore de translocation PopB, a été analysée *in vitro* par Western blot (Figure 33b).



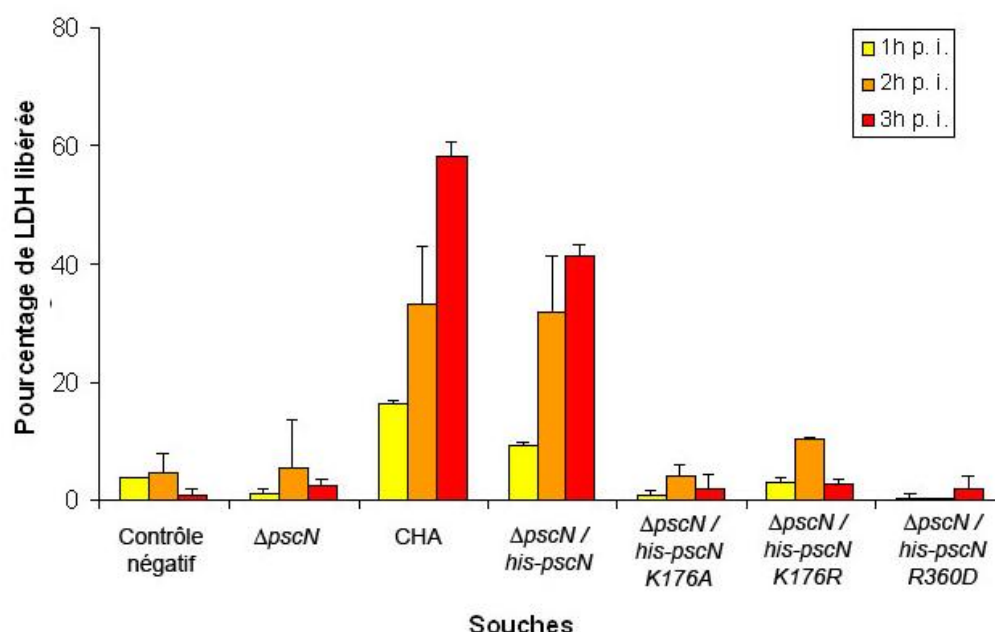
**Figure 33 : Analyse par Western blot de l'expression de PscN et de la sécrétion de PopB dans les différentes souches de *P. aeruginosa* :  $\Delta pscN$ ,  $\Delta pscN/his-pscN$ ,  $\Delta pscN/his-pscN_{K176A}$ ,  $\Delta pscN/his-pscN_{K176R}$ ,  $\Delta pscN/his-pscN_{R360D}$**

**a) Expression de PscN dans les différentes souches bactériennes**

**b) Niveau de sécrétion de la protéine du pore PopB du SST3 pour les différentes souches bactériennes. L'absence de détection de PopB correspond à un SST3 incapable de sécréter *in vitro*, et donc à un SST3 inactif.**

La souche de *P. aeruginosa* sauvage ainsi que la souche  $\Delta pscN/his-pscN$  ont un SST3 fonctionnel *in vitro* puisqu'elles sont capables de sécréter PopB. Par contre, en l'absence de l'ATPase, la protéine PopB n'est pas détectée dans le surnageant de sécrétion, ce qui confirme que PscN est indispensable à l'activité du SST3. Les souches exprimant l'ATPase mutée sont elles aussi incapables de sécréter PopB. Les acides aminés K176 du site catalytique et R360 ont donc un rôle primordial dans l'activité de l'ATPase du SST3.

Ces résultats ont été confirmés lors d'infections de cellules eucaryotes. En effet, lorsque *P. aeruginosa* possède un SST3 actif, capable de former le pore de translocation, les macrophages infectés perdent leur intégrité membranaire en 3 à 4h et des composants intracellulaires, comme la lactate déshydrogénase (LDH), sont libérés. La libération de LDH par les cellules infectées n'est pas observée lorsque le SST3 est inactivé. Le dosage de la LDH intracellulaire libérée par ces cellules au cours de l'infection traduit donc la cytotoxicité causée par le SST3 des bactéries.



**Figure 34 : Effet des mutations de l'ATPase PscN sur la cytotoxicité dépendante du SST3.**

*Pourcentage de LDH intracellulaire libérée par des macrophages de souris après 1h, 2h et 3h d'infection par différentes souches de P. aeruginosa : la souche n'exprimant pas l'ATPase  $\Delta pscN$ , la souche sauvage CHA, ainsi que les souches complémentées exprimant l'ATPase fusionnée à une étiquette hexa-histidine sans ou avec mutations ponctuelles :  $\Delta pscN / his-pscN$ ,  $\Delta pscN / his-pscN_{K176R}$ ,  $\Delta pscN / his-pscN_{K176A}$ ,  $\Delta pscN / his-pscN_{R360D}$ . Le contrôle négatif consiste en des cellules seules, non infectées.*

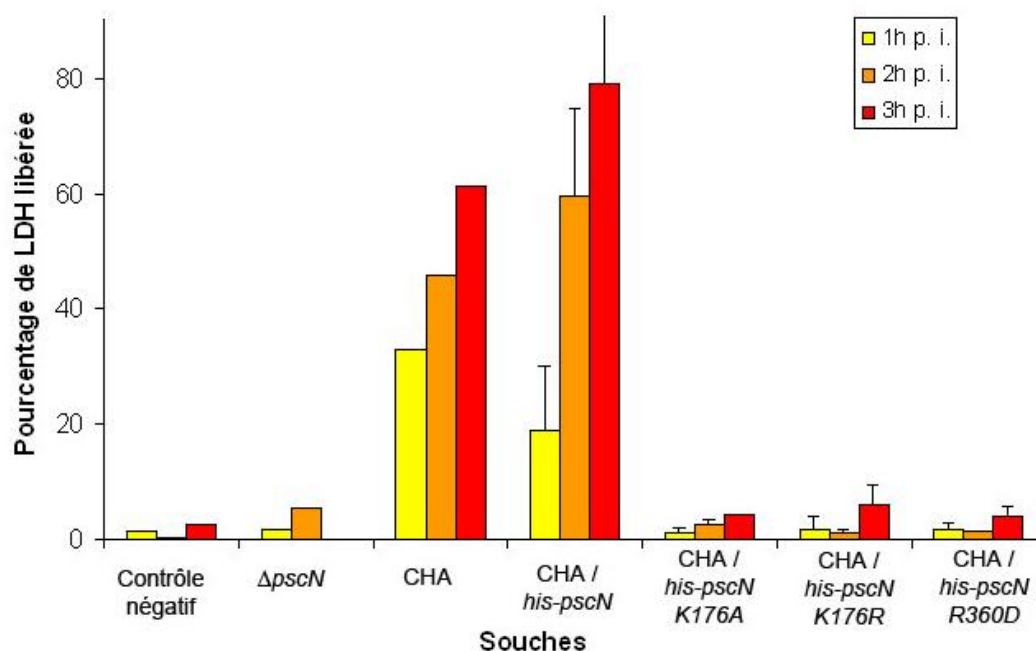
Comme observé sur la Figure 34, le pourcentage de cytotoxicité dépendant du SST3 envers les macrophages causée par la souche sauvage augmente au cours du temps. Le fait d'ajouter une étiquette hexa-histidine à l'extrémité N-terminale de l'ATPase PscN ne perturbe pas son activité puisque, comme la souche sauvage, la souche  $\Delta pscN/his-pscN$  est cytotoxique envers les cellules eucaryotes. Par contre, les souches exprimant l'ATPase PscN mutée perdent leur capacité cytotoxique envers les macrophages, et présentent un phénotype similaire au mutant  $\Delta pscN$ .

En conclusion, les mutations K176A, K176R et R360D dans le site actif de l'ATPase PscN rendent le SST3 inactif dans des tests de sécrétion *in vitro* aussi bien que dans des tests de cytotoxicité *in vivo*.

### 3) Effets dominants négatifs

Afin de mieux caractériser l'effet des mutations de cette ATPase, les plasmides portant les gènes codant pour l'ATPase mutée ont été introduits dans la souche sauvage CHA

exprimant l'ATPase native. Le phénotype cytotoxique de ces nouvelles souches envers les macrophages de souris a été évalué (Figure 35).



**Figure 35 : Cytotoxicité dépendant du SST3 des souches sauvages de *P. aeruginosa* exprimant l'ATPase mutée.**

*Pourcentage de LDH intracellulaire libérée par des macrophages de souris après 1h, 2h et 3h d'infection par différentes souches de *P. aeruginosa* : la souche n'exprimant pas l'ATPase  $\Delta pscN$ , la souche sauvage CHA, ainsi que les souches sauvages exprimant l'ATPase fusionnée à une étiquette hexa-histidine sans ou avec mutations ponctuelles : CHA / his-pscN, CHA / his-pscN<sub>K176R</sub>, CHA / his-pscN<sub>K176A</sub>, CHA / his-pscN<sub>R360D</sub>. Le contrôle négatif consiste en des cellules seules, non infectées.*

Les résultats montrent que les trois mutations, K176A, K176R et R360D, ont des effets dominants négatifs puisqu'elles provoquent la perte de la cytotoxicité de la souche sauvage. L'expression des deux protéines PscN, la protéine sauvage et la protéine synthétisée à partir du plasmide, sont toutes deux contrôlées par l'activateur transcriptionnel du SST3. En effet, l'ATPase fusionnée à l'étiquette histidine, mutée ou non, est exprimée dans le plasmide sous le contrôle du promoteur endogène de l'opéron *pcrGVH-popBD*, appelé *pG*. Comme l'ATPase endogène, His-PscN est donc synthétisée lorsque le SST3 est activé. Le plasmide utilisé est multicopies (5 à 10 par bactérie) ; il est donc possible que la proportion de protéine PscN produite par expression plasmidique soit un peu plus importante que celle produite naturellement par *P. aeruginosa*. De plus, l'expression des ATPases pourrait être vérifiée par des Western blots dirigés contre PscN, pour quantifier l'ATPase totale présente dans les extraits bactériens, et des anticorps dirigés contre l'étiquette histidine, pour quantifier l'ATPase mutée.

Les résultats observés sur la Figure 35 montrent que l'insertion de sous-unités inactives rend tout le complexe d'ATPase inactif. Une observation similaire avait été faite pour l'ATPase HrcN du SST3 de *X. campestris*, où l'insertion d'une sous-unité inactive conduisait à l'inactivation de tout l'oligomère d'ATPase (Lorenz et al. 2009).

Les trois souches exprimant l'ATPase PscN mutée respectivement en K176A, K176R et R360D peuvent donc être utilisées en tant que contrôle négatif lors de l'étude fonctionnelle de l'ATPase.

### B. Purification de l'ATPase

Des études *in vitro* de certaines ATPases de SST3 ont montré leur implication dans la préparation des effecteurs à la translocation. En effet, il a été montré que les ATPases InvC et HrcN étaient capables de dissocier les complexes chaperonnes-effecteurs SicP-SptP et HpaB-XopF1 respectivement (Akeda et al. 2005 ; Lorenz et al. 2009). La capacité de InvC à déplier l'effecteur SptP a par ailleurs été démontré (Akeda et al. 2005). Par contre, le rôle de l'ATPase du SST3 envers des substrats autres que les effecteurs n'a jamais été décrit. Nous disposons au laboratoire des complexes purifiés des protéines du translocon PopB et PopD avec leur chaperonne PcrH (Schoehn et al. 2003), ainsi que de la protéine de l'aiguille PscF avec sa chaperonne PscE-PscG (Quinaud et al. 2005).

L'utilisation de ces complexes permettrait pour la première fois d'évaluer *in vitro* le rôle de l'ATPase PscN sur la prise en charge des protéines du translocon et de l'aiguille du SST3 pour leur sécrétion. Dans cette perspective, des essais de purification de PscN ont été réalisés, afin de s'affranchir des effets de toutes les autres protéines exprimées par *P. aeruginosa*.

La purification de l'ATPase du SST3 des différentes bactéries à Gram négatif est très délicate car cette protéine est exprimée en faible quantité et est associée à la face cytosolique de la membrane interne, probablement par des interactions avec diverses protéines du SST3 (Jackson et al. 2000 ; Jouihri et al. 2003 ; Minamino et al. 2003 ; Pozidis et al. 2003). Différents essais de purification de l'ATPase YscN chez *Yersinia pestis* menés par Swietnicki et al sont restés infructueux et ont conduit ces auteurs à changer de stratégie en purifiant seulement le domaine catalytique de l'enzyme (Swietnicki et al. 2011).

Pour la purification de l'ATPase PscN du SST3 de *P. aeruginosa*, de nombreux essais de purification avaient été réalisés auparavant au laboratoire à partir de l'expression de la protéine chez *E. coli*.

La protéine a été obtenue dans des corps d'inclusion et les différentes techniques utilisées n'ont pas permis d'obtenir PscN soluble et active. Par contre, la protéine PscN présente dans les corps d'inclusion a été utilisée pour obtenir chez le lapin des anticorps spécifiques de cette protéine.

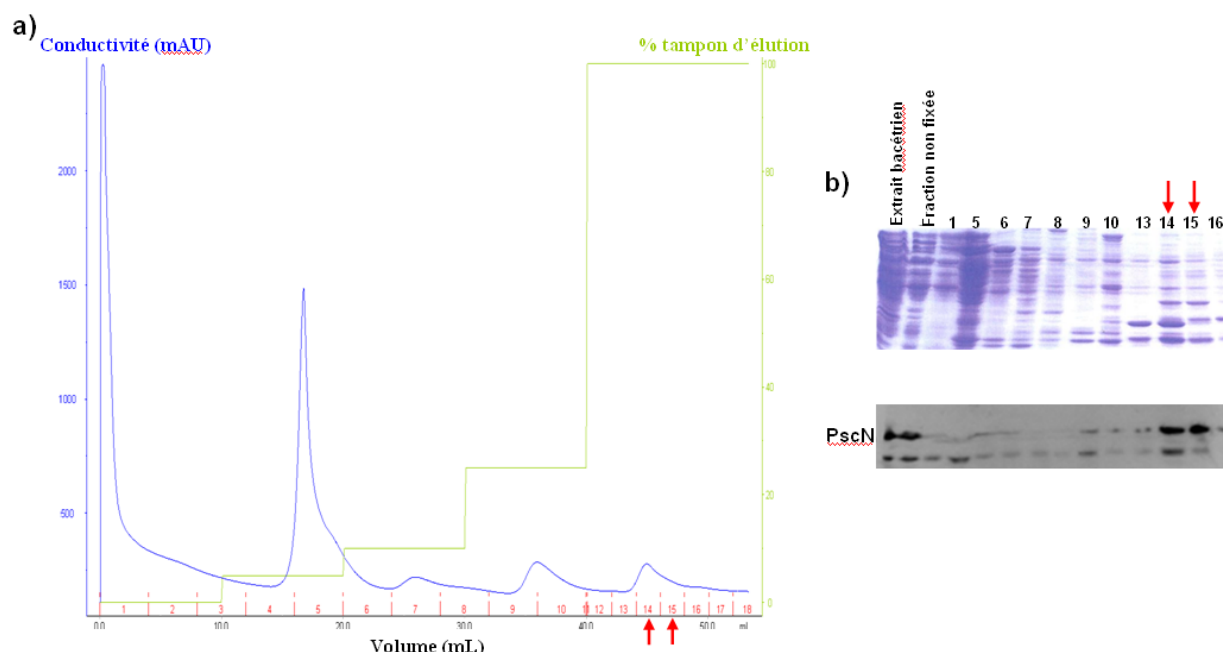
La stratégie utilisée pour purifier cette ATPase dans le cadre du projet de thèse a été d'exprimer la protéine directement dans *P. aeruginosa*. Des expériences préalables d'isolement des membranes bactériennes avaient montré que l'ATPase est localisée en partie dans les fractions membranaires mais aussi dans la fraction cytosolique soluble (résultats non montrés). L'ATPase PscN peut également être dissociée des membranes en utilisant un détergent, le triton (résultats non montrés).

Les essais de purification de l'ATPase PscN ont été principalement effectués sur ces fractions solubles afin de réduire le nombre d'étapes nécessaires à la préparation des échantillons biologiques à purifier.

*1) Purification sur colonne de nickel via une étiquette hexa-histidine suivie d'une chromatographie d'échange d'ions ou d'interaction hydrophobe*

Comme démontré précédemment (A.2), l'ATPase fusionnée à une étiquette hexa-histidine en N-terminal, His-PscN, est bien exprimée et est fonctionnelle dans *P. aeruginosa*. C'est pourquoi nous avons décidé de tenter une purification de cette protéine par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel, à partir des extraits bactériens dont le SST3 a été induit.

La séparation par chromatographie d'affinité est basée sur la forte interaction entre les histidines de la protéine de fusion et le nickel de la colonne. La protéine d'intérêt est ensuite éluée de la colonne par ajout de concentrations croissantes d'imidazole. Les fractions obtenues par la chromatographie ont été analysées par électrophorèse SDS-PAGE puis coloration au bleu de Coomassie pour évaluer la pureté des fractions et par Western blot avec des anticorps dirigés contre PscN.



**Figure 36 : Purification de His-PscN sur colonne de nickel à partir d'extraits de *P. aeruginosa*.**

**a) Chromatogramme obtenu lors de la purification d'affinité via l'étiquette Histidine**  
**b) Analyse de l'échantillon appliqué à la colonne de nickel (extrait bactérien), de l'échantillon non fixé (fraction non fixée) et des fractions éluées (numérotées de 1 à 16) par coloration au bleu de Coomassie et par Western blot avec un anticorps dirigé contre la protéine PscN.**

Après de nombreux essais et mises au point, les résultats de la chromatographie (Figure 36) montrent que l'ATPase His-PscN est éluée principalement dans les fractions 14 et 15 mais de nombreux contaminants sont encore présents.

Après avoir regroupé les fractions d'éluion contenant His-PscN en un seul échantillon, une **seconde étape de purification** a été appliquée sur cet échantillon afin d'améliorer la pureté de His-PscN. L'échantillon a tout d'abord été appliqué à une colonne d'exclusion de taille afin de débarrasser l'échantillon de l'imidazole et des sels et placer les protéines dans le tampon utilisé pour la chromatographie secondaire. Deux sortes de chromatographies secondaires ont ensuite été testées : échange d'anions ou interaction hydrophobe.

La chromatographie d'échange d'anions permet de séparer les protéines en fonction de leur charge. Malheureusement, la protéine His-PscN est perdue pendant la chromatographie d'exclusion de taille préalable à la chromatographie d'échange d'ions. Il est possible que la protéine d'intérêt soit restée accrochée à la colonne via des interactions non spécifiques du fait de la faible force ionique du tampon, ou bien qu'elle ait été dégradée dans ces conditions car l'ATPase homologue à PscN chez *EPEC* a été décrite comme instable en solution (Zarivach et al. 2007).

La chromatographie d'interaction hydrophobe permet quant à elle de séparer les protéines en fonction de leur hydrophobicité. L'étape de changement de tampon a permis de récolter les protéines dans le bon tampon de forte force ionique, mais les fractions éluées après la chromatographie d'interaction hydrophobe ne contiennent pas la protéine d'intérêt et ne présentent pas d'activité ATPase.

La protéine d'intérêt n'a peut être pas été éluée du fait d'une trop grande hydrophobicité. L'ATPase PscN fusionnée à l'étiquette hexa-histidine, exprimée dès le départ en faible quantité, pourrait également adhérer de façon non spécifique à la colonne. La quantité de protéine d'intérêt éluée serait tellement faible qu'elle ne serait pas détectée.

## 2) Purification de PscN fusionnée à une double étiquette « histidine » et « Strep »

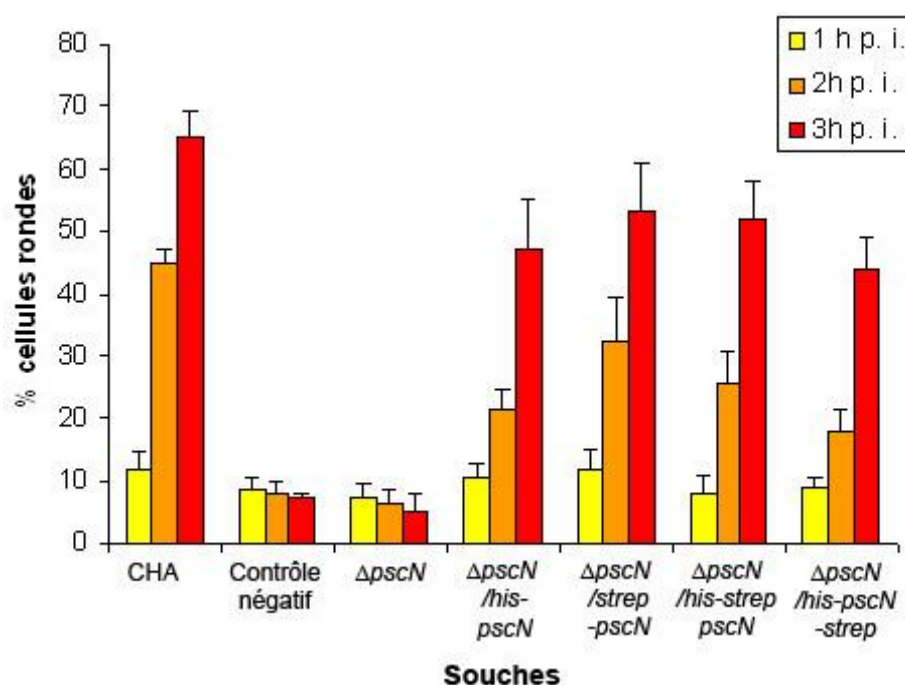
Les premiers essais de purification de l'ATPase His-PscN conduisaient soit à un mauvais degré de pureté soit à une perte de la protéine d'intérêt. Ces difficultés sont probablement dues à la faible quantité de His-PscN exprimée dans la bactérie.

Pour faire face à ces difficultés, une deuxième étiquette, le Strep tag, a été fusionnée en N ou C terminal de His-PscN pour faciliter la purification avec une autre chromatographie d'affinité. L'utilisation de l'étiquette Strep est réputée pour conduire à un degré de pureté très élevé, supérieur à 95% et pour être plus efficace que l'étiquette histidine pour les protéines faiblement exprimées (Bornhorst et al. 2011).

Les protéines de fusion obtenues sont notées His-Strep-PscN et His-PscN-Strep.

La première expérience a consisté à étudier l'expression et la fonctionnalité de ces protéines. Pour cela, des tests d'infection de cellules eucaryotes, les macrophages de souris et les cellules épithéliales A549, ont permis de vérifier que les souches  $\Delta pscN$  / *his-strep-pscN* et  $\Delta pscN$  / *his-pscN-strep* sont cytotoxiques, comme la souche de *P. aeruginosa* sauvage (Figure 37).

La cytotoxicité des bactéries envers les cellules A549 se traduit par une réorganisation du cytosquelette d'actine conduisant à un arrondissement des cellules.



**Figure 37 : Cytotoxicité dépendant du SST3 des souches sauvages de *P. aeruginosa* exprimant l'ATPase fusionnée à différentes étiquettes protéiques.**

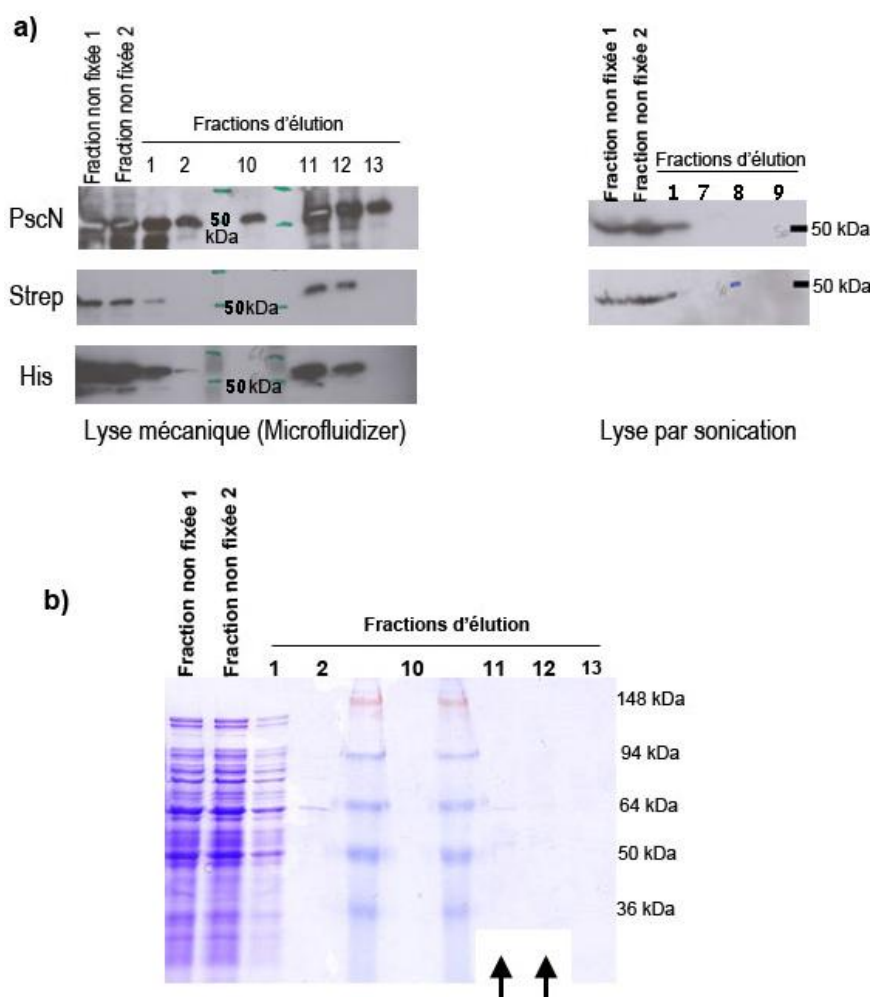
*Pourcentage de cellules épithéliales A549 arrondies après 1h, 2h et 3h d'infection par différentes souches de *P. aeruginosa* : la souche sauvage CHA, la souche n'exprimant pas l'ATPase  $\Delta$ pscN, ainsi que les souches  $\Delta$ pscN exprimant l'ATPase fusionnée à l'étiquette hexa-histidine en N terminal  $\Delta$ pscN/his-pscN ; à l'étiquette Strep en N terminal  $\Delta$ pscN/strep-pscN ; aux deux étiquettes hexa-histidine et Strep en N terminal  $\Delta$ pscN/his-strep-pscN ; et enfin à une étiquette histidine en N terminal et une étiquette Strep en C terminal  $\Delta$ pscN/his-pscN-strep.*

Les purifications de His-PscN-Strep et His-Strep-PscN par chromatographies d'affinité ont ensuite été réalisées par une purification *via* l'étiquette histidine puis *via* l'étiquette Strep. La technique de chromatographie d'affinité par l'étiquette Strep est basée sur la forte interaction entre la biotine et la streptavidine. La colonne est constituée d'un analogue de la streptavidine, la « streptactine » dont les capacités d'interaction ont été améliorées tandis que le Strep tag est un petit peptide capable de se lier à cette streptactine au niveau du site d'interaction avec la biotine. Les protéines sont éluées de la colonne par un analogue de la biotine, la desthiobiotine.

Lorsque les fractions éluées lors de la chromatographie sur colonne de nickel sont soumises à la chromatographie secondaire sur colonne Streptactine, toute la protéine est perdue puisqu'elle n'est détectée par Western blot dans aucune fraction d'élution (résultats non montrés). La quantité de protéine d'intérêt était très faible avant la seconde étape de purification et une partie a dû se fixer de façon non spécifique à la colonne de chromatographie.



Un autre essai de purification a été réalisé en effectuant les deux chromatographies dans l'autre ordre. Le protocole de purification d'affinité par le Strep tag a tout d'abord été mis au point. Par exemple, les conditions de lyse des bactéries se sont révélées être très importantes pour la suite de la purification. Comme le montre la Figure 38-a, la purification est nettement améliorée lorsque les souches de *P. aeruginosa* sont lysées mécaniquement par la presse de French ou le microfluidizer par rapport à leur lyse par sonication. En effet, la protéine ne se fixe plus du tout à la colonne lorsque les bactéries sont cassées par sonication. Il est possible que la sonication conduise à la formation d'aggrégats de protéines, empêchant l'accessibilité des étiquettes protéiques (Stathopulos et al. 2004).



**Figure 38 : Mises au point de la purification sur colonne Streptactine de l'ATPase PscN portant une étiquette hexa-histidine en N terminal et Strep en C terminal, notée His-PscN-Strep.**

**a) Effet des conditions de lyse des bactéries sur l'efficacité de purification.** Les bactéries  $\Delta pscN$  / *his-pscN-strep* ont été lysées mécaniquement au microfluidizer ou bien par les ultrasons au sonicateur. Les fractions solubles de ces lysats ont ensuite été appliquées à une colonne Streptactine et les fractions d'élution analysées par Western blot dirigés contre PscN, l'étiquette Strep et l'étiquette hexa-histidine (His).

**b) Purification de His-PscN-Strep par la colonne Streptactine après lyse des bactéries à la presse de French.** Analyse des fractions éluées par coloration au bleu de Coomassie. Les flèches indiquent les fractions d'élution contenant His-PscN-Strep

Les rendements de purification sont similaires pour His-PscN-Strep et pour His-Strep-PscN. Les fractions éluées sont beaucoup plus pures que lors de la purification d'affinité par l'étiquette His, puisque peu de protéines autres que l'ATPase sont détectées par coloration au bleu de Coomassie (Figure 38-b). Par contre, une partie de la protéine n'est pas fixée à la colonne (Figure 38-a).

Ce problème de fixation à la colonne pourrait s'expliquer par la non accessibilité de l'étiquette Strep d'une partie de la population de PscN. Par exemple, l'étiquette n'est peut être pas accessible lorsque la protéine est oligomérisée. C'est pourquoi des tentatives de purification ont été menées en utilisant un détergent pour améliorer l'accessibilité de l'étiquette Strep ou à partir des membranes solubilisées. Malheureusement, ces conditions n'ont pas amélioré la fixation de l'ATPase PscN portant les étiquettes Strep et His ni sa pureté. Pour la suite des expériences, les purifications ont été réalisées dans les conditions les plus simples, c'est-à-dire à partir du cytosol de *P. aeruginosa* et en l'absence de détergent.

Afin d'essayer d'augmenter la quantité de protéine fixée à la colonne, un deuxième passage de la fraction d'échantillon non fixée sur la colonne d'affinité au Strep tag a été effectué. Il n'a malheureusement pas permis de fixer plus de protéines (résultats non montrés). Le problème de fixation de PscN fusionnée à des étiquettes protéiques ne vient donc pas de la saturation de la colonne d'affinité.

Un dernier essai d'amélioration de la purification a été réalisé mais est resté infructueux. L'extrait cytosolique bactérien avait été dilué pour être certain de ne pas saturer la colonne. De plus, un volume plus faible a été appliqué à la colonne car le fait de passer un volume d'échantillon trop important pourrait détacher les protéines de la colonne.

D'autres pistes avaient été envisagées pour favoriser l'accessibilité et la fixation de l'ATPase PscN taggée à la colonne, comme les concentrations en sel ou pH du tampon ou l'élimination des contaminants biotinylés par des billes de Streptavidine, mais n'ont pas été réalisées faute de temps. De plus, l'échantillon issu de la chromatographie par le Strep tag est beaucoup plus pur que celui issu de la chromatographie par le His tag. Les échantillons issus de la chromatographie d'affinité par le Strep tag ont été soumis à une seconde étape de purification par His tag, mais toute la protéine PscN a été perdue lors de l'étape de changement de tampon.

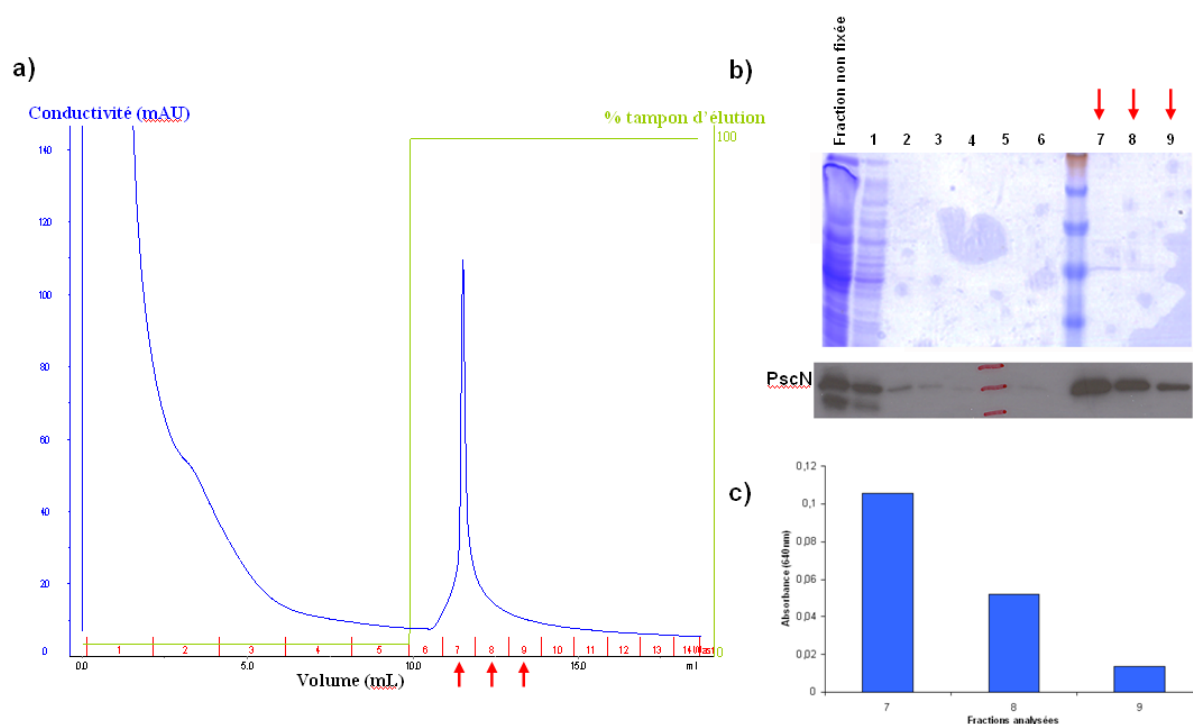
Finalement, les meilleures conditions de purification de l'ATPase PscN sont obtenues avec une seule étape de purification par le Strep tag. Par la suite, la purification a été menée avec l'ATPase portant uniquement l'étiquette Strep, Strep-PscN. L'échantillon ainsi obtenu est partiellement purifié. Il pourrait tout de même être utilisé pour étudier le rôle de cette

ATPase sur les protéines du SST3, en comparaison avec un contrôle négatif consistant en l'échantillon obtenu de la même façon avec la souche délétée de PscN ou bien avec les souches exprimant l'ATPase mutée.

### 3) Caractérisation de l'ATPase PscN partiellement purifiée

#### a- Chromatographie d'affinité par le Strep tag

Il est important de vérifier que l'ATPase Strep-PscN partiellement purifiée par la chromatographie d'affinité est fonctionnelle. Pour cela, des tests d'activité ATPase ont été réalisés. La Figure 39 montre que la chromatographie d'affinité par le Strep tag permet d'obtenir dans les fractions 7, 8 et 9 la protéine Strep-PscN partiellement purifiée.



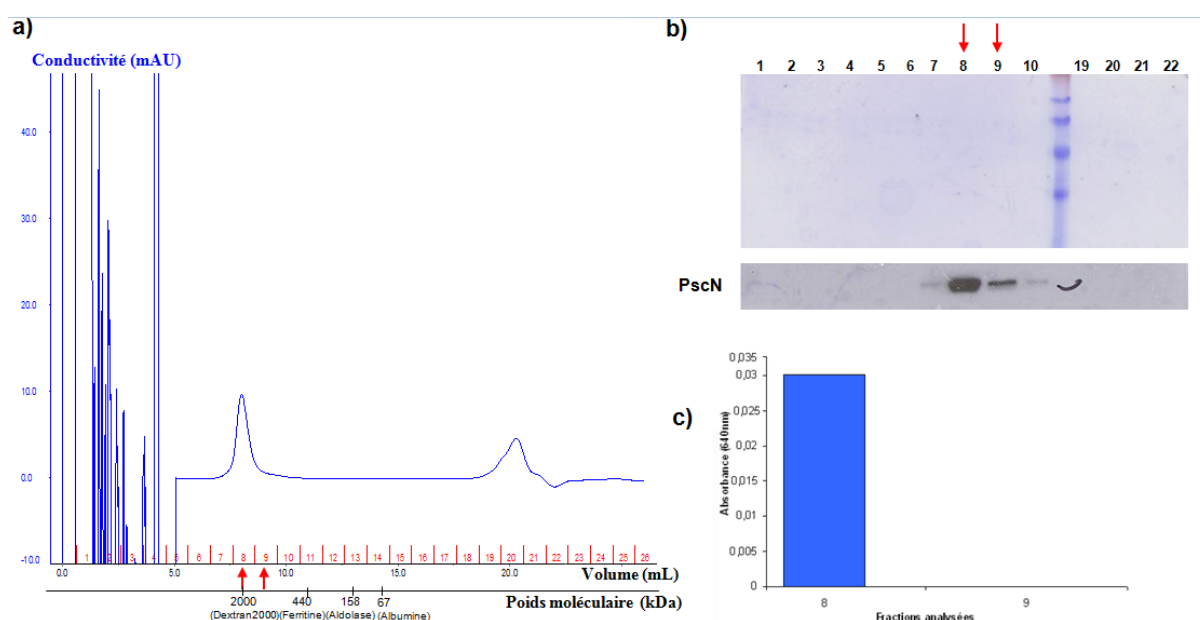
**Figure 39 : Chromatographie d'affinité sur colonne Streptactine pour la purification de l'ATPase PscN fusionnée à une étiquette Strep en N-terminal.**  
*L'échantillon appliqué à la colonne est la fraction soluble extraite de la souche de *P. aeruginosa*  $\Delta$ pscN / strep-pscN.*

- a) Chromatogramme obtenu lors de la purification via l'étiquette Strep*
- b) Analyse de l'échantillon non fixé à la colonne Streptactine (fraction non fixée) et des fractions éluées lors de cette purification d'affinité par coloration au bleu de Coomassie et par Western blot dirigé contre la protéine PscN d'intérêt*
- c) Activité ATPase des fractions purifiées par la colonne Streptactine contenant Strep-PscN. La détection d'activité ATPase est réalisée par le test au vert de malachite. Après 1h30 de réaction, l'absorbance à 640 nm est proportionnelle à la quantité de phosphate libéré lors de l'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase.*

La protéine Strep-PscN semi purifiée semble fonctionnelle puisqu'elle présente bien une activité ATPase, proportionnelle à la quantité de protéine détectée par Western blot. Cependant, un contrôle négatif, avec Strep-PscN mutée semi purifiée serait nécessaire pour vérifier que l'activité ATPase détectée est bien due à PscN et pas à une protéine contaminante possédant aussi une activité ATPase.

#### b- Chromatographie d'exclusion de taille

Afin de mieux caractériser la protéine partiellement purifiée, une chromatographie d'exclusion de taille a été réalisée, afin de séparer les protéines selon leur taille.



**Figure 40 : Chromatographie d'exclusion de taille réalisée sur la protéine Strep-PscN partiellement purifiée.**

*L'ATPase Strep-PscN a été au préalable partiellement purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne Streptactine.*

*a) Chromatogramme obtenu lors du passage de l'échantillon partiellement purifié de Strep-PscN sur une colonne d'exclusion de taille (10 à 600 kDa).*

*b) Analyse des fractions éluées lors de la purification sur colonne d'exclusion de taille (numérotées de 1 à 22) par coloration au bleu de Coomassie et par Western blot avec un anticorps dirigé contre la protéine PscN d'intérêt*

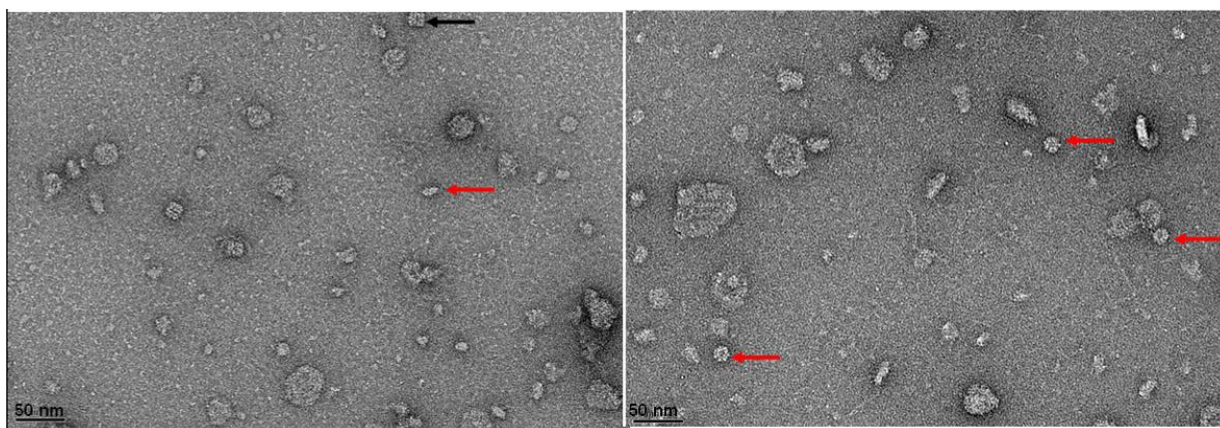
*c) Activité ATPase des fractions contenant Strep-PscN après séparation par chromatographie d'exclusion de taille. La mesure de l'activité ATPase est réalisée par le test au vert de malachite. Après 1h30 de réaction, l'absorbance à 640 nm est proportionnelle à la quantité de phosphate libéré lors de l'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase.*

L'ATPase Strep-PscN est éluée dans les fractions 8 et 9 (Figure 40). Ces fractions sont éluées juste après le volume mort de la colonne. Elles ne correspondent pas à des agrégats mais à un grand complexe de plus de 1000 kDa. Les ATPases des autres SST3 bactériens sont généralement des hexamères ou des dodecamères (Moraes et al. 2008) ; (Akeda et al. 2005) ;

(Pozidis et al. 2003) ; (Muller et al. 2006). Le poids moléculaire de Strep-PscN étant d'environ 50 kDa, le complexe d'ATPase identifié par la chromatographie d'exclusion de taille pourrait être un oligomère (hexamère ou dodecamère) interagissant avec des partenaires.

#### c- Analyse de Strep-PscN par microscopie électronique

Comme Strep-PscN est purifiée sous forme de grands complexes, l'échantillon partiellement purifié a été observé en coloration négative par microscopie électronique par Daphna Fenel et Guy Schoehn de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble.



**Figure 41 : Clichés de microscopie électronique des fractions partiellement purifiées de Strep-PscN.**

*Les échantillons partiellement purifiés de Strep-PscN ont été obtenus en appliquant sur une colonne Streptactine la fraction soluble des bactéries  $\Delta$ pscN / strep-pscN. Ils ont été analysés en coloration négative par microscopie électronique. Les particules qui pourraient correspondre à un complexe Strep-PscN sont indiquées par une flèche rouge. La flèche noire montre la présence d'un contaminant, GroEL.*

L'échantillon est très hétérogène (Figure 41), ce qui traduit la présence de nombreuses protéines et peut être de fragments de membranes bactériennes. Un type de particule d'environ 17,5 nm de diamètre et 7 nm de hauteur a été repéré. Il pourrait correspondre en taille à l'ATPase Strep-PscN. En effet, l'empilement de deux hexamères de l'ATPase HrcN du SST3 de *Xanthomonas campestris* mesure  $11,5 \pm 1$  nm de diamètre et  $12 \pm 2$  nm de hauteur (Muller et al. 2006). La hauteur de la particule observée pourrait correspondre à un seul hexamère de Strep-PscN. Son diamètre est par contre plus élevé, peut être du fait d'interaction avec d'autres protéines. Une piste pour confirmer la nature de cette particule serait d'effectuer un immunomarquage à l'or, mais cette technique n'était pas envisageable à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble. Les clichés de microscopie électronique ont également mis en évidence la présence d'un contaminant : la chaperonne GroEL. Ce contaminant, dont le rôle est d'aider au repliement des protéines, présente une activité ATPase. Des techniques

existent pour éliminer ce contaminant très fréquent, comme des lavages avec de l'ATP-MgCl<sub>2</sub> ou le clivage du Strep tag (Graslund et al. 2008).

d- Recherche de partenaires de PscN par spectrométrie de masse

L'échantillon de Strep-PscN partiellement purifiée a été analysé par spectrométrie de masse par Alexandra Kraut et Yohann Couté, de la plateforme EdyP du laboratoire de Biologie à Grande Echelle du CEA de Grenoble, dans le but d'identifier toutes les protéines présentes. Les résultats obtenus sont présentés dans un tableau en annexe 1. La méthodologie utilisée étant très sensible, plus de 150 protéines ont été détectées dans l'échantillon. En se basant sur le nombre de peptides identifiés pour chaque protéine, le constituant principal est bien PscN, qui représente environ 22% de la totalité des protéines de l'échantillon, mais des protéines contaminantes sont aussi retrouvées. Aucune des protéines co-purifiées avec l'ATPase n'est présente dans des proportions importantes, elles ne représentent jamais plus de 4% des protéines totales. Par exemple, une biotine carboxylase, enzyme impliquée dans la synthèse des acides gras, a été co-purifiée probablement du fait de son association avec des composés biotinylés. D'autres contaminants, comme une acyl CoA carboxyl transferase, qui joue un rôle dans le métabolisme des lipides, ou la protéase Lon qui dégrade les protéines mal repliées, ont été identifiés. La présence de la chaperonne GroEL, visualisée en microscopie électronique, a été confirmée, et une chaperonne ayant une activité similaire, appelée DnaK, a également été détectée. Ces deux chaperonnes ont une activité ATPase, ce qui confirme la nécessité de réaliser un contrôle négatif avec Strep-PscN mutée (c'est-à-dire sans activité catalytique) pour étudier l'activité de Strep-PscN.

De façon intéressante, des protéines du SST3 ont également été identifiées, comme les toxines ExoS, T et Y, la protéine PscL, les protéines du pore PopB et D et leur chaperonne PcrH, la chaperonne PscB de la protéine PopN ou encore les protéines de régulation du SST3 ExsD et ExsA. Elles pourraient être des partenaires de l'ATPase PscN. Pour vérifier ces interactions malgré l'important bruit de fond, il sera indispensable de comparer les protéines des échantillons partiellement purifiés à partir des souches de *P. aeruginosa*  $\Delta pscN$  et  $\Delta pscN/StrepPscN$ . Les souches exprimant l'ATPase mutée devraient aboutir à la détection des mêmes protéines que pour la souche  $\Delta pscN/StrepPscN$ . Elles pourraient éventuellement faciliter leur détection en bloquant les interactions de l'ATPase avec ces partenaires. D'ailleurs, la construction d'un mutant de l'ATPase PscN au niveau du site WalkerB pourrait être plus appropriée pour le blocage des interactions des substrats du SST3 avec l'ATPase, car

elle permettrait de maintenir la liaison de l'ATP mais pas son hydrolyse (Vale 2000 ; Shiue et al. 2006 ; Gauthier et al. 2003).

### C. Conclusion et perspectives

Dans un premier temps, différents mutants de l'ATPase PscN ont été construits chez *P. aeruginosa*. Par homologie avec d'autres ATPases de SST3 bactériens, les mutations ont été effectuées au niveau du site catalytique et de l'acide aminé inséré dans le site actif de la sous-unité adjacente. Tous conduisent à un phénotype identique à celui observé en l'absence de PscN, c'est-à-dire une perte de l'activité du SST3. De plus, les effets observés sont dominants négatifs. Ces mutants pourront être utilisés en tant que contrôle négatif de l'activité ATPase. Ils pourraient aussi permettre de capturer ses partenaires protéiques, pris en charge de façon transitoire par l'ATPase native, puisqu'ils seraient bloqués avec cette enzyme en attendant d'être préparés pour leur export par le SST3.

Malgré de nombreuses difficultés liées à la faible quantité d'ATPase PscN, un protocole de purification de cette protéine fusionnée par un peptide Strep en son domaine N terminal a été mis au point. Il a permis d'obtenir des fractions partiellement purifiées de Strep-PscN. L'analyse de ces fractions par chromatographie d'exclusion de taille a montré que Strep-PscN était présente sous forme de grands complexes de plus de 1000 kDa. Ces fractions présentent également une activité ATPase, qui pourrait correspondre à celle de Strep-PscN. Leur observation par microscopie électronique a mis en évidence la présence de particules en forme de cylindre creux qui pourraient correspondre en taille à Strep-PscN associée à d'autres protéines. Malheureusement, la chaperonne GroEL, possédant une activité ATPase est aussi détectée. L'analyse en spectrométrie de masse de ces fractions a permis d'identifier les protéines présentes en plus de la protéine majoritaire Strep-PscN. Au delà de contaminants divers, certaines protéines du SST3 ont ainsi été détectées, et pourraient copurifier avec PscN du fait d'interactions avec cette ATPase.

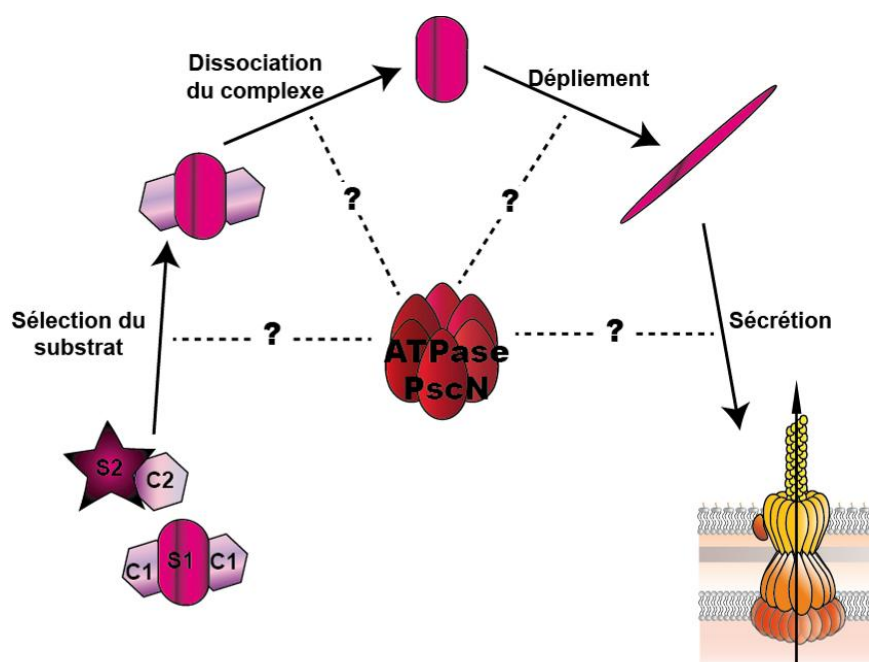
Les premières expériences à réaliser pour poursuivre l'étude de l'ATPase seraient de confirmer les résultats en utilisant un contrôle négatif. En particulier, il faudrait vérifier que l'activité ATPase d'une fraction partiellement purifiée de PscN mutée pour son activité catalytique est beaucoup plus faible que celle correspondant à PscN. De même, il faudrait vérifier par spectrométrie de masse qu'aucune protéine du SST3 n'est trouvée dans la fraction de purification à partir d'une souche de *P. aeruginosa* délétée de *pscN* ou bien exprimant PscN non « taggée ». Un autre moyen de confirmer les interactions avec des protéines du



SST3 serait d'analyser les fractions partiellement purifiées de Strep-PscN par électrophorèse en conditions non dénaturantes.

L'ATPase PscN du SST3 de *P. aeruginosa* a été étudiée pour la première fois et une stratégie de purification de cette protéine a été mise au point. L'obtention d'échantillons semi-purifiés de PscN ouvre la porte à de nombreuses pistes pour explorer son rôle sur les protéines du SST3.

En effet, l'ATPase PscN de *P. aeruginosa* n'a jamais été étudiée d'un point de vue fonctionnel. Ses rôles hypothétiques seraient de participer à la dissociation de complexes chaperonnes cytoplasmiques-substrats du SST3 avant leur sécrétion, de déplier les substrats avant leur sécrétion ou encore d'être impliquée dans la hiérarchie de sécrétion (Figure 42).



**Figure 42 : Schéma des rôles potentiels de l'ATPase PscN du SST3 de *P. aeruginosa*.**

*PscN* pourrait être impliquée dans la hiérarchie de sécrétion en sélectionnant les substrats à sécréter dans un ordre précis. Elle pourrait également, grâce à l'énergie libérée lors de l'hydrolyse de l'ATP, se charger de dissocier les complexes chaperonnes cytoplasmiques – substrats et/ou de déplier les substrats pour les préparer à la sécrétion. Enfin, elle pourrait participer à la sécrétion en tant que telle des substrats.

Ces différents rôles pourraient être étudiés *in vitro* grâce à l'ATPase PscN partiellement purifiée, comme détaillé ci-après.

La première activité prédite de l'ATPase PscN est la prise en charge de la dissociation des complexes chaperonnes cytoplasmiques-effecteurs pour préparer ces effecteurs à la sécrétion. Cela a déjà été observé pour l'ATPase du SST3 de *S. enterica* et de *X. campestris*



(Akeda et al. 2005 ; Lorenz et al. 2009). Les chaperonnes et effecteurs étant spécifiques à chaque SST3, il serait important de rechercher le rôle de l'ATPase PscN sur des complexes chaperonnes-exotoxines de *P. aeruginosa*. De plus, d'autres protéines du SST3, telles que les composants de l'aiguille ou du pore de translocation, sont également associées à des chaperonnes cytoplasmiques avant leur sécrétion. Il serait donc intéressant de déterminer si PscN est impliquée également dans la dissociation de ces complexes. Cette étude serait très novatrice puisque la dissociation de complexes autres que les chaperonnes-effecteurs par l'ATPase du SST3 n'a jamais été étudiée chez aucune bactérie.

Pour cela, des protéines du SST3 pourront être exprimées chez *E. coli* avec leur chaperonne cytoplasmique fusionnée à une étiquette hexa-histidine. Des protocoles de purification ont déjà été développés au laboratoire pour les complexes :

- i. Chaperonne-effecteur : HisExoU-SpcU
- ii. Chaperonne-translocateur : HisPcrH-PopB et HisPcrH-PopD
- iii. Chaperonne-aiguille : HisPscE- PscF -PscG

Les fractions partiellement purifiées de l'ATPase PscN sauvage ou mutée dans le site actif peuvent être mises en contact avec ces complexes liés à des colonnes de nickel par le tag histidine. L'analyse des fractions éluées permettra de déterminer si les complexes sont dissociés par l'ATPase sauvage. S'il y a dissociation des complexes, la chaperonne et son substrat seront récupérées dans deux fractions différentes. Par contre, s'il n'y a pas de dissociation, ces deux protéines seront présentes dans la même fraction.

Pour confirmer ce rôle, des tests d'activité des protéines du SST3 pourront être utilisés. En effet, lorsqu'elles sont associées à leur chaperonne, les protéines du pore PopB et PopD sont inactives. Par contre, lorsqu'elles sont seules, elles sont capables de s'insérer spontanément dans des liposomes pour former des pores. Des méthodes sont déjà disponibles au laboratoire pour mesurer la formation de pores dans des liposomes (Faudry et al. 2006) et pour vérifier la présence des protéines du pore dans ces liposomes (séparation par gradient sucrose). Elles pourront permettre de vérifier que les protéines du pore sont dissociées de leur chaperonne par PscN sauvage. De même, la protéine de l'aiguille PscF est capable de polymériser dès qu'elle est dissociée de ses chaperonnes (Quinaud et al. 2005). Il sera donc possible d'observer la polymérisation de PscF sous l'effet de la fraction partiellement purifiée d'ATPase PscN, par diffraction de la lumière ou bien électrophorèse en conditions non dénaturantes.

La deuxième activité de PscN pourrait être le dépliement des substrats avant leur sécrétion. Le dépliement d'une toxine par l'ATPase InvC avait été constaté chez *S. enterica* (Akedo et al. 2005), mais n'a jamais été étudié pour d'autres protéines du SST3. Le dépliement de différents substrats du SST3, purifiés au préalable, pourra être analysé sous l'action de l'ATPase PscN partiellement purifiée. Ce dépliement pourra être suivi par des méthodes spectroscopique ou par des différences de sensibilité aux protéases.

Enfin, l'ATPase PscN pourrait être impliquée dans la hiérarchie de sécrétion, puisqu'elle serait l'un des premiers composants du SST3 à interagir avec les substrats du SST3 pour les préparer à leur sécrétion. Il serait intéressant d'observer si l'ATPase PscN a une préférence pour des complexes chaperonnes-substrats sécrétés très tôt par rapport à des complexes dont les substrats sont sécrétés plus tardivement. Par exemple, la protéine PscN partiellement purifiée pourrait être mise en contact avec les complexes ExsC-ExsE, PscE-PscG-PscF, PcrH-PopB et PscU-ExoU. Son affinité envers ces différents complexes pourrait alors être comparée.

Un projet intéressant concernerait la recherche d'inhibiteurs de l'activité de PscN en réalisant un criblage d'une chimiothèque sur l'ATPase partiellement purifiée. Ce criblage serait basé sur l'identification de molécules capables d'inhiber l'activité enzymatique ou bien d'empêcher de façon spécifique l'interaction avec les substrats du SST3. Cette stratégie nécessite une purification préalable de PscN et de ses substrats. Cette inhibition très spécifique de l'interaction de l'ATPase PscN avec ses partenaires est particulièrement intéressante puisqu'elle permettrait d'éviter des effets indésirables sur d'autres ATPases. Ces molécules, en bloquant l'ATPase PscN, permettraient de bloquer tout le SST3 de *P. aeruginosa*. Il serait intéressant de tester le pouvoir inhibiteur de molécules connues pour bloquer le SST3 de différentes bactéries mais dont le mode d'action n'est pas connu. Par exemple, un phenoxyacetamide bloquant la translocation des effecteurs par le SST3 de *P. aeruginosa* (Aiello et al. 2010), ou encore les salicylidene acylhydrazides capables d'inhiber la sécrétion des SST3 de *Yersinia spp.*, *Chlamydia spp.*, *Salmonella spp* et d'empêcher l'assemblage du SST3 de *S. flexneri* (Keyser et al. 2008 ; Veenendaal et al. 2009 ; Duncan et al. 2012).

De même, il faudrait étudier la capacité d'inhibition de PscN par une molécule non cytotoxique décrite pour bloquer l'activité de l'ATPase du SST3 de *Y. pestis* (Swietnicki et al. 2011). A condition d'être sans danger pour les organismes eucaryotes et de pénétrer dans le

cytoplasme bactérien, ces molécules inhibitrices pourraient à terme constituer un élément thérapeutique intéressant pour la lutte contre *P. aeruginosa*. Elles pourraient même présenter un intérêt pour combattre d'autres micro-organismes pathogènes possédant un SST3, tels que *Yersinia spp.*, *S. flexneri* ou *Salmonella spp.*, étant donné les fortes homologies entre les ATPases des SST3.

En conclusion, ce travail a permis d'étudier pour la première fois l'ATPase PscN du SST3 de *P. aeruginosa* et de développer une méthodologie de purification de cette protéine qui permettra à l'avenir de mieux la caractériser *in vitro*. De nombreuses perspectives sont en effet envisagées, pour mieux comprendre le rôle de cette enzyme sur les substrats du SST3 et éventuellement pour identifier des molécules inhibitrices de son activité dans une optique thérapeutique. Un étudiant de Master 2, Bakhos Jneid, poursuit actuellement ce projet de recherche.

## **II. Etude de la protéine ExsB**

Le gène *exsB* est localisé dans l'opéron de régulation du SST3 de *P. aeruginosa*, et certains auteurs ont suggéré que la protéine correspondante, ExsB, n'était pas synthétisée (Goranson et al. 1997). La localisation génétique indiquerait sa participation dans la régulation du SST3. Cependant, par homologie avec la protéine YscW de *Yersinia spp.*, ExsB pourrait être une pilotine, c'est-à-dire avoir un rôle sur l'assemblage du composant de la membrane externe du SST3. Les travaux réalisés au cours de cette thèse avaient pour objectifs de préciser la structure et le rôle de la protéine ExsB dans le SST3 de *P. aeruginosa*.

La protéine ExsB a tout d'abord été caractérisée d'un point de vue structural à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble. Pour compléter cette caractérisation, son expression et sa localisation ont été étudiés chez *P. aeruginosa*. Ces travaux ont été publiés dans Journal of Molecular Biology ((Izore et al. 2011), article en annexe 3).

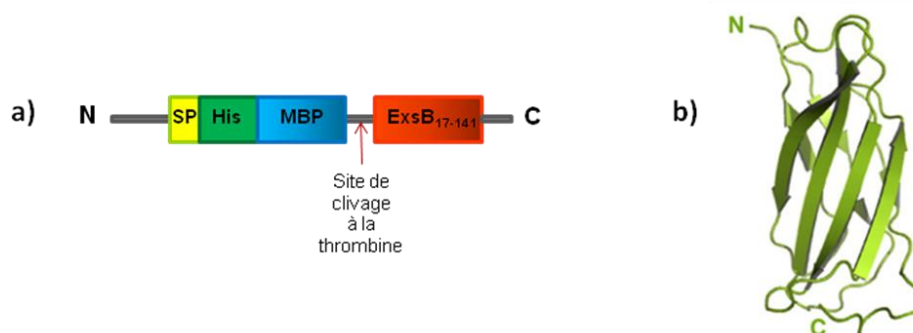
Son rôle a ensuite été recherché. Outre l'étude de son activité potentielle dans la régulation du SST3, différentes approches ont été mises en œuvre pour étudier son

implication dans la virulence bactérienne, dans l'activité du SST3 et enfin dans l'assemblage de la machinerie.

## A. Caractérisation de la protéine ExsB

### 1) Structure de ExsB

Ce travail a été réalisé par Thierry Izoré, dans l'équipe dirigée par Andréa Dessen à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble. Afin de déterminer la structure de ExsB, la protéine a été produite en fusion avec des étiquettes hexa-histidine et MBP (Maltose binding protein) chez *E. coli*, comme représenté sur la figure 1a. Ces étiquettes ont facilité la purification de ExsB par deux chromatographies successives, chromatographie d'affinité par l'étiquette histidine suivie par une chromatographie d'échange de cations. L'étiquette MBP permet d'améliorer la solubilité de la protéine. Les étiquettes peptidiques ont ensuite été éliminées par clivage à la thrombine. La protéine pure, sélénométhionylée, a permis d'obtenir des cristaux. L'analyse des données de diffraction (par la méthode SAD, pour « Single-wavelength Anomalous Diffraction ») de ces cristaux au synchrotron de Grenoble (European Synchrotron Radiation Facility) a permis de résoudre la structure de ExsB (Figure 43b).



**Figure 43 : Caractérisation structurale de ExsB**

*a) Construction utilisée pour la purification de ExsB. SP est le signal peptide permettant l'export de la protéine. His et MBP sont les étiquettes protéiques hexa-histidine et maltose binding protein.*

*b) Structure de ExsB (Izoré et al, 2011)*

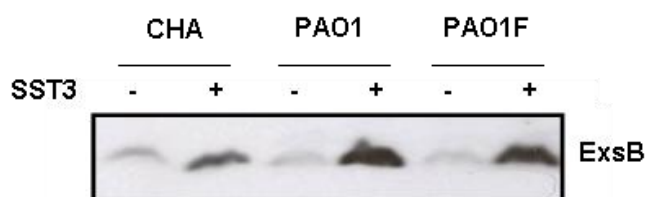
La protéine ExsB est composée de 7 feuillets  $\beta$  et d'une petite hélice  $\alpha$ . Elle possède également un pont disulfure entre 2 cystéines très proches en C-terminal (aux positions 125 et 129). Bien que ces 2 acides aminés soient conservés chez l'homologue d'ExsB chez *Yersinia spp.*, le rôle de ce pont disulfure n'est pas connu puisqu'il ne semble pas nécessaire pour l'activité de la protéine chez *Yersinia spp.* (Allaoui et al. 1995). La structure révèle également 2 zones chargées qui pourraient être importantes pour la fonction de la protéine ExsB. La

première est un domaine basique et donc chargé positivement, qui pourrait être impliqué dans l'interaction de ExsB avec des lipides chargés négativement de la membrane externe. Ce type d'interaction a déjà été observé pour d'autres protéines, telles que la tyrosine kinase Src des cellules eucaryotes (Sigal et al. 1994). La seconde est un petit domaine acide à l'extrémité N-terminale de ExsB, formant le bord d'un domaine en forme de cratère et identifiée par le logiciel SURFNET comme un domaine d'interaction potentiel. Cette zone plutôt acide pourrait donc participer à l'interaction avec des partenaires protéiques, comme par exemple d'autres protéines du SST3 (Izore et al. 2011). De façon intéressante, la protéine TssJ du SST6 de *E. coli*, récemment caractérisée, est structurellement très proche de ExsB. Elle interagit avec l'extrémité périplasmique d'un composant de la membrane interne du SST6 et pourrait participer au repliement ou à la stabilité de cette protéine (Felisberto-Rodrigues et al. 2011).

La structure de ExsB ayant été résolue, l'étape suivante a été de caractériser cette protéine chez *P. aeruginosa*. Un outil indispensable pour cette caractérisation a été l'utilisation d'un anticorps dirigé spécifiquement contre ExsB. Pour cela, le sérum d'un lapin ayant reçu des injections de la protéine purifiée (à partir de l'expression dans *E. coli*) a été obtenu par la société Covalab.

## 2) Expression de ExsB dans différentes souches de *P. aeruginosa*

L'expression de la protéine ExsB par *P. aeruginosa* n'avait jamais été prouvée car des essais pour la détecter avaient échoués (Goranson et al. 1997). Afin de lever cette incertitude, l'expression de la protéine ExsB a été évaluée dans différentes souches de *P. aeruginosa*. La protéine purifiée à partir de l'expression dans *E. coli* a été utilisée pour obtenir de bons anticorps, indispensables pour cette étude. Les trois souches testées sont PAO1, qui a été isolée d'une blessure en Australie (Wolfgang et al. 2003) ; PAO1F, dérivée de l'isolat de PAO1 et ayant un SST3 plus actif ; et CHA, un isolat clinique d'un patient atteint de mucoviscidose connu pour avoir un SST3 très actif.



**Figure 44 : Analyse par immunoblot de l'expression de ExsB dans des extraits bactériens des souches de *P. aeruginosa* CHA, PAO1 et PAO1F.**

*Les bactéries ont été cultivées dans des conditions d'induction (+) ou de répression (-) du SST3*

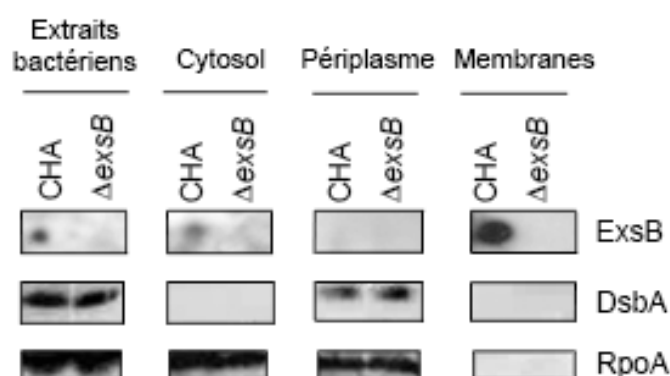
L'analyse des extraits bactériens par Western blot (Figure 44) montre que la protéine ExsB est bien produite par les trois souches, et que sa production est plus importante lorsque le SST3 est activé. La quantité de bactéries déposées étant identique pour chaque souche (normalisée en fonction de la D.O.<sub>600nm</sub>), une plus forte expression de ExsB est observée dans les souches PAO1 et PAO1F alors que l'on pouvait s'attendre à une production plus importante chez CHA puisque CHA a un SST3 plus actif.

La protéine ExsB n'avait pas été détectée par Goranson J. et ses collaborateurs (1997) chez *P. aeruginosa* mais les essais avaient été réalisés à partir de l'expression de différentes formes de l'opéron de régulation sous le contrôle du promoteur T7 chez *E. coli* et PAO1 de *P. aeruginosa*. De plus, les détections étaient indirectes, avec un marquage au soufre 35 des cystéines et méthionines des protéines, ou l'utilisation d'anticorps anti CAT pour reconnaître la protéine chimérique ExsB-CAT.

L'expression de la protéine ExsB par *P. aeruginosa* a été démontrée. L'objectif a été ensuite de déterminer sa localisation dans la bactérie.

### 3) Localisation de ExsB

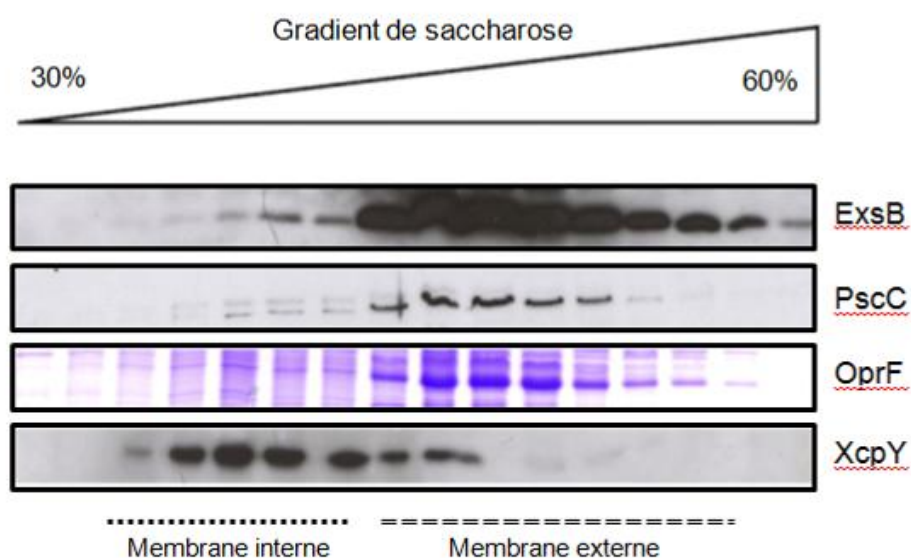
D'après les prédictions basées sur la séquence d'acides aminés de ExsB, la protéine pourrait être une lipoprotéine car elle possède une séquence consensus, appelée « lipobox », permettant la liaison aux lipides comme décrit dans la partie V-B. de l'introduction. Elle pourrait donc se trouver dans les membranes de la bactérie. Pour vérifier cette localisation, un fractionnement cellulaire a été réalisé par formation de sphéroplastes et ultracentrifugation, puis les fractions cytosolique, périplasmique et membranaire ont été analysées par Western blot.



**Figure 45 : Compartimentation cellulaire pour l'étude de la localisation de ExsB.**  
**Détection de ExsB par immunoblot dans les extraits bactériens totaux des souches de *P. aeruginosa* sauvage (CHA) et dont le gène *exsB* a été inactivé ( $\Delta exsB$ ) et dans les compartiments cellulaires : cytosol, périplasme et membranes.**

Les résultats (Figure 45) montrent que la protéine ExsB est située majoritairement dans les membranes. De faibles quantités de protéines sont également détectées dans le cytoplasme. Cela peut être dû à une légère contamination du cytosol par les membranes. Néanmoins, la protéine ExsB étant produite dans le cytosol, il est cohérent de la détecter dans cette fraction. Cette expérience a permis de montrer que la protéine ExsB est localisée dans les fractions membranaires. Pour déterminer sa localisation exacte, les membranes interne et externe ont été séparées en fonction de leur densité sur gradient de saccharose. Les fractions collectées ont été analysées par :

- coloration au bleu de Coomassie pour visualiser les porines de la membrane externe,
- Western Blot avec un anticorps dirigé contre XcpY pour identifier les fractions de membrane interne
- Western blot avec des anticorps dirigés contre ExsB et PscC.



**Figure 46 : Etude de la localisation de ExsB au sein des membranes bactériennes.**  
*Analyse des fractions obtenues lors de la séparation des membranes interne et externe de la souche de *P. aeruginosa* sauvage CHA.*

Ces résultats montrent que la protéine ExsB est localisée dans la membrane externe de la bactérie, tout comme la sécrétine PscC du SST3. Cette localisation est en accord avec les prédictions puisque l'analyse de la séquence de ExsB avait révélé que cette protéine était homologue à des lipoprotéines de la famille des pilotines, attachées à la membrane externe de différentes bactéries à Gram négatif (comme indiqué dans la partie V-C. de l'introduction). La protéine ExsB pourrait donc bien être une pilotine de la sécrétine PscC.

En conclusion, la protéine ExsB a été caractérisée d'un point de vue structural et son expression chez *P. aeruginosa* a été étudiée. Elle présente deux zones chargées qui pourraient être importantes pour l'interaction avec ses partenaires. Comme prédit par sa séquence d'acides aminés, cette protéine est bien synthétisée et est localisée dans la membrane externe de la bactérie.

Le rôle de ExsB est néanmoins tout à fait inconnu. Elle pourrait participer à la régulation du SST3 ou bien être une pilotine de la sécrétine PscC. Pour étudier le rôle potentiel de ExsB dans la régulation, l'activité et l'assemblage du SST3 chez *P. aeruginosa* une souche délétée de *exsB* a été construite à l'aide de la technique de SOE PCR. Sa complémentation chromosomique a également été effectuée, tout d'abord à l'aide du plasmide pIApC *exsB* permettant l'expression de la protéine ExsB sous le contrôle de son promoteur endogène pC. Malheureusement, l'utilisation de ce plasmide conduisait à une trop forte expression de la protéine et à de sérieux défauts de croissance de la bactérie, probablement du fait de la présence de plusieurs copies du plasmide et de la localisation du gène *exsB* directement en aval de son promoteur et non pas dans l'opéron de régulation. La complémentation a finalement été réalisée dans le chromosome et la souche complémentée ainsi obtenue est capable de se développer à un taux de croissance similaire à la souche sauvage. Le niveau d'expression de ExsB chez cette souche est similaire à celui de la souche sauvage (Figure 47).



**Figure 47 : Analyse par Western blot de l'expression de ExsB lors de la complémentation de la souche de *P. aeruginosa* dépourvue de *exsB*.**

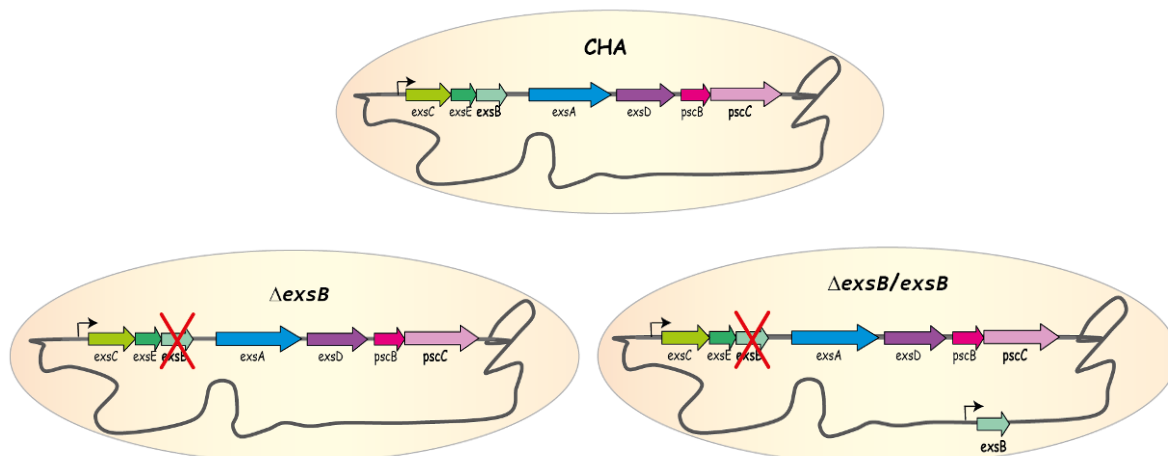
**a) Niveau d'expression de ExsB dans les extraits bactériens concentrés 10 fois de *P. aeruginosa* sauvage (CHA), dépourvue du gène codant pour ExsB ( $\Delta exsB$ ) et complémentée par un plasmide ( $\Delta exsB + pexsB$ ).**

**b) Niveau d'expression de ExsB dans les extraits bactériens concentrés 10 fois de *P. aeruginosa* sauvage (CHA), dépourvue du gène codant pour ExsB ( $\Delta exsB$ ) et complémentée directement dans le chromosome ( $\Delta exsB/exsB$ ).**

Afin d'étudier le rôle de la protéine ExsB, le phénotype des souches mutante dépourvue de *exsB* ( $\Delta exsB$ ) et complémentée ( $\Delta exsB/exsB$ ) a été analysé en comparaison avec celui de la



souche sauvage (CHA). La figure suivante présente ces souches obtenues en comparaison avec la souche sauvage.



**Figure 48 : Souches de *P. aeruginosa* utilisées pour l'étude de la protéine ExsB.**  
*La souche sauvage est l'isolat clinique CHA. La souche mutante  $\Delta exsB$  a été obtenue en supprimant le gène codant pour ExsB du chromosome. Sa complémentation  $\Delta exsB/exsB$  a été construite en insérant le gène *exsB* sous le contrôle de son promoteur d'origine *pC* dans le chromosome de la souche  $\Delta exsB$ .*

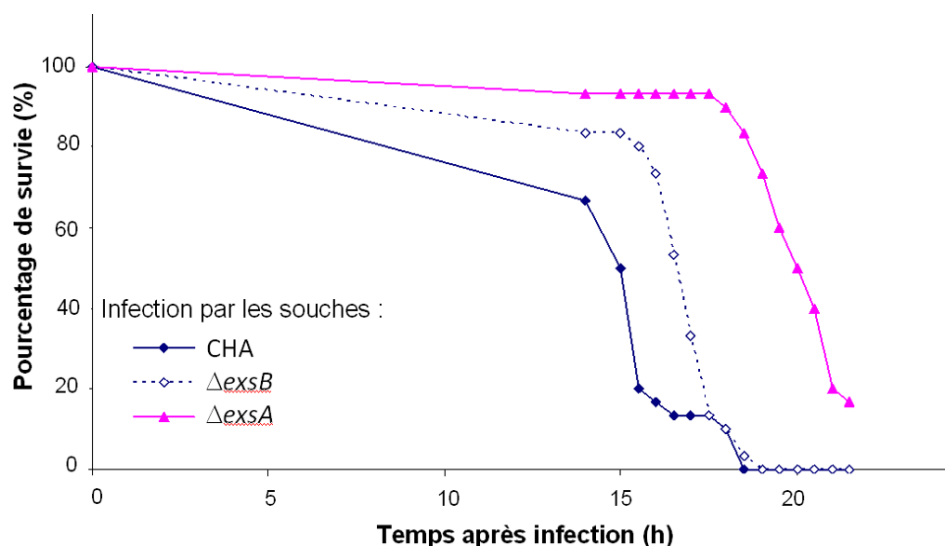
## B. Effets de la délétion de *exsB* sur la virulence dans des modèles d'infection animaux

L'effet de la délétion de *exsB* sur la virulence des bactéries *in vivo* a été testé dans deux modèles d'infection : les drosophiles et les souris.

### 1) Effets de la délétion de *exsB* lors d'infections aiguës de drosophiles

Une première expérience a été réalisée sur des drosophiles afin d'identifier si la protéine ExsB a un rôle dans la virulence de *P. aeruginosa*. Les drosophiles sont un modèle d'infection intéressant puisqu'elles possèdent un système immunitaire inné possédant des similarités avec celui des mammifères (Hoffmann et al. 1999). Leur utilisation en tant qu'hôte modèle de *P. aeruginosa* a déjà été montrée (D'Argenio et al. 2001). Des infections aiguës au bacille pyocyanique peuvent être produites en piquant les insectes. Ce modèle d'infection est donc facile à mettre en œuvre. Dans ce cas, la virulence des souches bactériennes est directement liée à la présence d'un SST3 actif (Fauvarque et al. 2002). Le gène codant pour ExsB étant localisé dans un opéron de régulation du SST3, il est probable que la protéine correspondante ait un rôle dans ce système. Des drosophiles ont donc été infectées par piqûre

avec les souches de *P. aeruginosa* sauvage ou dépourvue de *exsB*. La souche bactérienne dépourvue du gène codant pour ExsA, l'activateur du SST3, a été utilisée comme contrôle négatif. Cette expérience a été menée en collaboration avec Marie-Odile Fauvarque et Perrine Viargues, de l'équipe « Génétique et chémogénétique » du Laboratoire de Biologie à Grande Echelle, au CEA de Grenoble.



**Figure 49 : Courbes de survie des drosophiles infectées par les souches de *P. aeruginosa* sauvage (CHA), délétée de *exsA* ( $\Delta exsA$ ), et délétée de *exsB* ( $\Delta exsB$ )**

Les premiers résultats semblaient montrer un retard dans la mortalité des mouches infectées par les bactéries ne possédant pas ExsB (Figure 49).

ExsB pourrait donc être impliquée dans la virulence due au SST3 lors d'infections aiguës.

Cependant, ces résultats n'ont pu être reproduits. Ceci est peut être dû au fait que la différence de mortalité observée en l'absence de ExsB était assez faible par rapport à la différence observée en l'absence d'un SST3 actif.

De plus, la manière de piquer les mouches ou la charge bactérienne prélevée à l'extrémité de l'aiguille sont des facteurs de variabilité pouvant expliquer la difficulté à observer de faibles variations de toxicité entre les souches.

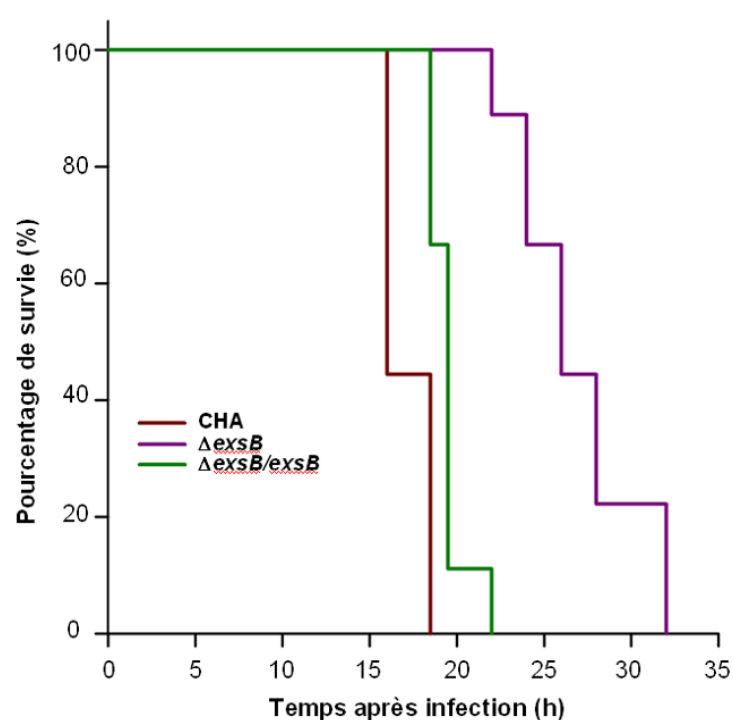
## 2) Effets de la délétion de *exsB* lors d'infections aiguës de souris

Un second modèle d'infection a été utilisé sur des souris afin de vérifier si la protéine ExsB est bien impliquée dans la virulence de *P. aeruginosa*, comme suggéré par la première expérience réalisée sur les drosophiles.

Bien que l'utilisation de souris soit plus contraignante (cycle de vie plus long, agrément du comité d'éthique de l'animalerie), ces mammifères sont très utilisés puisque leur infection par inhalation permet de mimer des pneumonies aiguës à *P. aeruginosa* (Tang et al. 1995).

Ce type d'infection a été choisi car le SST3 est un facteur de virulence très actif durant les infections aiguës et la protéine ExsB pourrait être impliquée dans l'activité de ce système. Enfin, le système immunitaire des souris est relativement proche de celui des hommes (Mizgerd et al. 2008).

Ces tests ont été réalisés en collaboration avec Philippe Huber et Stéphanie Bouillot de l'équipe.



Comparaison	p-value obtenue par le test LogRank
CHA par rapport à $\Delta exsB$	1,7E-03
$\Delta exsB$ par rapport à $\Delta exsB/exsB$	1,9E-03
CHA par rapport à $\Delta exsB/exsB$	4,2E-03

**Figure 50 : Courbe de survie des souris infectées par les souches de *P. aeruginosa* sauvage (CHA), délétée de *exsB* ( $\Delta exsB$ ) et complétée ( $\Delta exsB/exsB$ ), et analyse statistique des résultats.**

Comme le montrent les courbes de survie (Figure 50), les souris infectées par la souche de *P. aeruginosa* mutante ( $\Delta exsB$ , courbe rouge) meurent au bout de 26,9 heures en moyenne, c'est-

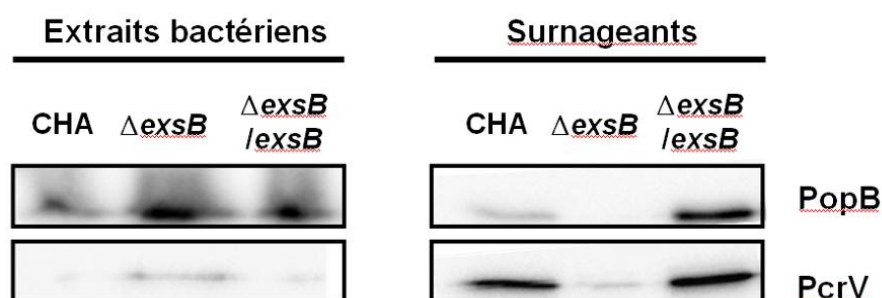
à-dire environ 8 heures après les animaux infectés par les souches sauvage (CHA, courbe bleue) et complémentée ( $\Delta exsB/exsB$ , courbe verte). La mortalité des souris est donc retardée lorsqu'elles sont infectées par des bactéries délétées de *exsB*. Cette différence est significative (p value inférieure à 0,01 d'après le test du LogRank). En conclusion, ce test d'infection *in vivo* montre que ExsB joue un rôle dans les infections aiguës.

### C. Rôle de ExsB dans l'activité du SST3 *in vitro*

Les expériences d'infection réalisées précédemment sur des animaux ont démontré l'importance de la protéine ExsB dans la virulence et suggèrent un rôle dans l'activité du SST3. Pour étudier le mécanisme moléculaire d'action de ExsB, nous avons utilisé une batterie de tests phénotypiques et biochimiques permettant de refléter l'activité du SST3.

L'activité du SST3 peut être contrôlée facilement *in vitro* en étudiant par Western blot le niveau d'expression de substrats du SST3 dans les bactéries mais aussi en détectant leur sécrétion dans le milieu extracellulaire.

Les souches de *P. aeruginosa* sauvage, dépourvue de *exsB* et complémentée, ont été cultivées dans des conditions de déplétion en calcium pour induire le SST3. Les culots bactériens et les surnageants correspondants ont été analysés par Western blot.



**Figure 51 : Expression (dans les extraits bactériens) et sécrétion (dans les surnageants) des translocateurs hydrophobe et hydrophile PopB et PcrV du SST3 des souches de *P. aeruginosa* sauvage (CHA), dépourvue de *exsB* ( $\Delta exsB$ ) et complémentée ( $\Delta exsB/exsB$ ).**

En l'absence de ExsB, une diminution de la sécrétion des protéines du SST3 est observée (Figure 51), aussi bien pour la protéine du pore de translocation PopB que pour le translocateur hydrophile PcrV. En parallèle, il y a une accumulation intracellulaire de ces protéines. Ces résultats suggèrent que les protéines sont correctement produites mais sont mal exportées par le SST3 lorsque la protéine ExsB est absente.

Par contre, la souche complémentée  $\Delta exsB/exsB$  sécrète des quantités plus importantes de PopB et PcrV que la souche sauvage CHA, alors que l'on s'attendait à des niveaux de sécrétion similaires dans ces deux souches. Le SST3 semble donc suractivé dans la souche complémentée. Cela pourrait s'expliquer par la localisation génétique de *exsB*.

Le gène codant pour ExsB est en effet situé dans l'opéron de régulation du SST3. Il est donc possible que la délétion de *exsB* conduise à une modification de cet opéron, avec par exemple une stabilisation de l'ARN messager et par suite à une suractivation du SST3.

Cette suractivation serait visible dans la souche complémentée  $\Delta exsB/exsB$  puisque pour la complémentation le gène *exsB* a été réintroduit non pas à sa place originelle dans l'opéron de régulation mais ailleurs dans le chromosome. L'opéron de régulation de cette souche  $\Delta exsB/exsB$  est donc toujours dépourvu de *exsB* et modifié.

#### **D. Effet de la délétion du gène codant pour ExsB sur l'opéron de régulation du SST3**

L'étude de l'expression et de la sécrétion de substrats du SST3 *in vitro* a révélé que le système pourrait être suractivé dans la souche complémentée  $\Delta exsB/exsB$ . Il est également possible que la protéine ExsB ait un rôle dans la régulation du SST3, étant donné que son gène est situé dans l'opéron de régulation.

Par ailleurs, la protéine homologue à ExsB chez *Yersinia spp.*, YscW, semble avoir un rôle dans la régulation puisqu'elle est impliquée dans la dépendance du SST3 au calcium, d'après des travaux effectués quelques années avant d'étudier le rôle de pilotine de YscW (Allaoui et al. 1995). En effet, le SST3 est activé uniquement en l'absence de calcium, mais l'absence de YscW chez *Yersinia spp.* conduit à une activation permanente du système, quelque soit la concentration en calcium.

Des expériences ont donc été réalisées pour étudier l'effet de la délétion de *exsB* sur l'activation du SST3 et sur l'opéron de régulation.

##### *1) Effets de la délétion de ExsB sur l'activation du SST3*

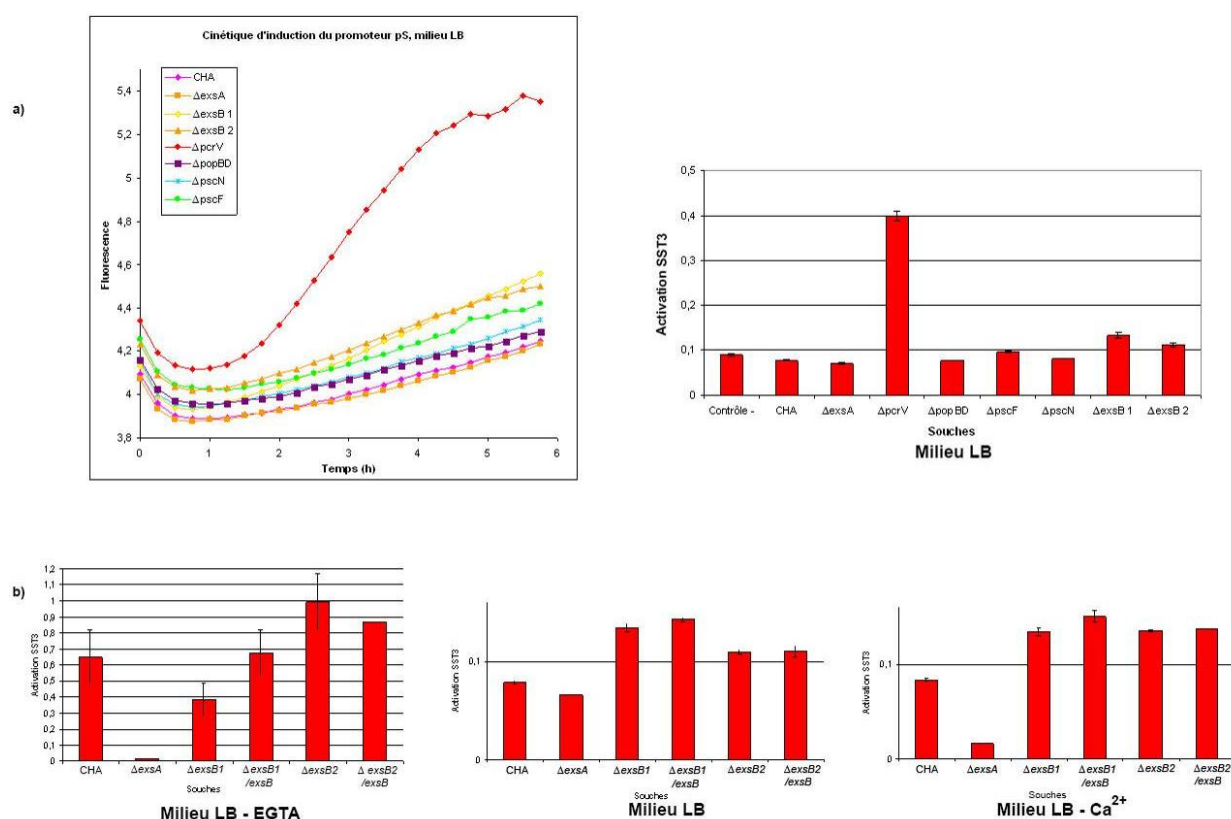
L'activation du SST3 a été étudiée grâce à un plasmide rapporteur développé au laboratoire par Khady Sall. Ce plasmide possède le promoteur de la toxine ExoS, appelé pS, en amont du gène codant pour la GFP. Lorsque le SST3 est actif, l'activateur transcriptionnel

ExsA se fixe au niveau du promoteur pS, permettant ainsi l'expression de la GFP et donc l'émission d'une fluorescence verte.

Plusieurs souches dont différents gènes du SST3 ont été délétes ont été comparées pour l'activité GFP en utilisant un fluorimètre à plaques.

Deux clones ont été utilisés pour les souches ne possédant pas le gène *exsB* afin de confirmer les effets observés.

L'essai a été effectué dans des conditions où le SST3 est induit par déplétion en calcium ou bien non induit (dans du milieu de culture non supplémenté ou bien supplémenté en calcium).



**Figure 52 : Analyse de l'activation du SST3 des souches de *P. aeruginosa* dans différentes conditions.**

**a) A gauche :** Cinétique d'activation du promoteur pS fusionné à la protéine fluorescente GFP (pS-GFP) au cours du temps lorsque le SST3 n'est pas induit. Les souches sauvage (CHA), délétes des gènes du SST3 codant pour l'activateur ExsA ( $\Delta exsA$ ), la protéine de pointe PcrV ( $\Delta pcrV$ ), les protéines du pore PopBD ( $\Delta popBD$ ), la protéine de l'aiguille PscF ( $\Delta pscF$ ), l'ATPase PscN ( $\Delta pscN$ ) et la protéine ExsB ( $\Delta exsB1$  et  $\Delta exsB2$  pour les deux clones) ont été cultivées dans du milieu LB sans additif. **A droite :** les activités du promoteur pS-GFP correspondantes. Ces activités ont été calculées en mesurant la pente de la cinétique d'activation entre 2h et 3h30.

**b) Activités du promoteur pS-GFP dans des conditions d'induction du SST3 (milieu LB supplémenté d'EGTA et de  $MgCl_2$ ) et de non induction (milieu LB puis milieu LB supplémenté de  $CaCl_2$ ) pour les souches de *P. aeruginosa* sauvage (CHA), déléte de l'activateur ExsA ( $\Delta exsA$ ), délétes de ExsB ( $\Delta exsB1$  et  $\Delta exsB2$ ) et leurs complémentations chromosomiques ( $\Delta exsB1/exsB$  et  $\Delta exsB2/exsB$ ).**

Comme attendu, les bactéries ne possédant pas l'activateur ExsA sont incapables d'activer leur SST3, quelques soient les conditions de culture (Figure 52b). Comme prévu également, la souche sauvage de *P. aeruginosa* active son SST3 seulement dans des conditions de déplétion en calcium.

Les souches délétées des gènes codant pour la protéine du pore PopB, la protéine de l'aiguille PscF et l'ATPase PscN ont tout à fait le même profil que la souche sauvage (résultats montrés uniquement lorsque le SST3 n'est pas induit) (Figure 52a).

Par contre, les bactéries ne produisant pas la protéine de pointe PcrV activent leur SST3 même lorsqu'il n'y a pas de déplétion en calcium, dans du milieu de culture sans additif.

Un phénomène similaire avait été observé chez la souche de *P. aeruginosa* PAK délétée de *pcrV*, puisqu'une sécrétion constitutive de l'effecteur ExoS avait été observée, y compris sans déplétion en calcium (Rietsch et al. 2005).

Il n'avait par contre pas été confirmé chez la souche CHA, qui a été utilisée comme souche de référence pour tous ces travaux de thèse. En effet, aucune sécrétion des protéines du SST3 n'avait été détectée lorsque le milieu de culture bactérien n'était pas déplété en calcium (Goure et al. 2004).

Ainsi, les résultats d'activation du SST3 présentés ci-dessus (Figure 52a) confirment le phénotype de la souche  $\Delta pcrV$ , avec une activation du système y compris en présence de calcium. Ils ne sont pas en contradiction avec les observations de (Goure et al. 2004) puisque les méthodes utilisées pour rendre compte de l'activation du SST3 sont différentes.

Il est possible que les effecteurs soit bien produits par la souche  $\Delta pcrV$  mais pas sécrétés lorsqu'il n'y a pas de déplétion en calcium. Par contre, une concentration élevée en calcium continue de réprimer l'expression du système (résultats non montrés).

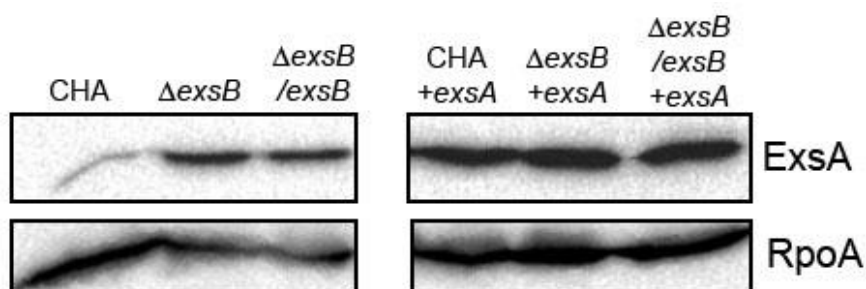
Concernant les souches de *P. aeruginosa* délétée de *exsB*, et sa complémentation chromosomique, deux clones différents ont été utilisés afin de confirmer les résultats observés (Figure 52b).

En l'absence de *exsB*, le SST3 est légèrement suractivé de façon reproductible dans des conditions où le SST3 n'est pas induit (en présence de calcium). Cependant, cet effet n'est pas dû à l'absence de ExsB en tant que telle puisque la souche complémentée avec le gène *exsB* dans le chromosome présente le même phénotype.

Il pourrait donc y avoir une suractivation de l'activateur ExsA du SST3 lorsque le gène *exsB* a été délété dans l'opéron de régulation.

## 2) Effets de la délétion de *ExsB* sur l'expression de l'activateur du SST3, *ExsA*

Afin de confirmer les résultats obtenus lors de l'analyse de l'activation du SST3, un test d'expression de l'activateur transcriptionnel ExsA a été réalisé pour la souche sauvage, la souche mutante dépourvue de *exsB* et la souche complémentée.



**Figure 53 : Expression de ExsA dans les différentes souches de *P. aeruginosa***  
**Expression de ExsA, l'activateur transcriptionnel du SST3, détectée par immunoblot dans les**  
**extraits bactériens des souches de *P. aeruginosa* sauvage (CHA), délétée de *exsB* ( $\Delta exsB$ ) et**  
**complémentée ( $\Delta exsB/exsB$ ).**  
**L'utilisation du plasmide pDD2 pour la surexpression de ExsA, notée +exsA, permet de restaurer**  
**des niveaux d'expression de ExsA équivalents dans toutes les souches. La protéine cytoplasmique**  
**RpoA (RNA polymérase) est utilisée comme contrôle de charge.**

Comme visualisé sur ce Western blot (Figure 53), la quantité d'activateur ExsA produite par les souches mutante et complémentée est effectivement supérieure à celle de la souche sauvage. Le fait de supprimer *exsB* de l'opéron de régulation a probablement un effet de stabilisation de l'ARN messager de tout l'opéron. Au contraire, Goranson et al (1997) avaient constaté une diminution de l'expression de ExsA en l'absence de *exsB*, mais leur mutant  $\Delta exsB$  a été construit en éliminant aussi les 80 nucléotides de part et d'autre du gène, ce qui conduit à une troncation du gène en amont, *exsE*, qui n'était pas identifié à l'époque.

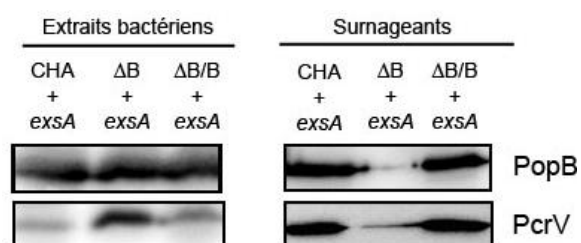
Cette surexpression de l'activateur ExsA lorsque *exsB* est délété pourrait masquer des petites différences phénotypiques, notamment entre la souche sauvage et la souche mutante. Afin de mieux comparer les phénotypes des différentes souches de *P. aeruginosa*, le plasmide pDD2, noté +*exsA* dans la suite du travail, a été introduit. Ce plasmide permet une surexpression constitutive de ExsA, l'activateur transcriptionnel du SST3, et donc de restaurer des niveaux d'expression de cet activateur similaires dans toutes les souches (Figure 53).



En conclusion, la protéine ExsB ne semble pas impliquée dans la régulation. Par contre, la délétion du gène *exsB* conduit à une surexpression de l'activateur ExsA du SST3. Cet effet est dit polaire et n'est pas lié à l'activité de la protéine ExsB. Pour s'affranchir de cet effet polaire, un plasmide permettant l'expression d'un niveau équivalent de ExsA dans toutes les souches a été utilisé, en particulier pour comparer finement les différences de phénotypes entre les différentes souches de *P. aeruginosa*.

#### E. Rôle de ExsB dans l'activité du SST3 *in vitro* en prenant en compte l'effet de la délétion de *exsB* sur l'opéron de régulation

L'implication de ExsB dans l'activité du SST3, étudiée dans la partie C de ce chapitre, a été à nouveau analysée en s'affranchissant de l'effet polaire de la délétion de *exsB*. Pour cela, les souches de *P. aeruginosa* sauvage, mutante et complémentée, portant le plasmide pour la surexpression constitutive de ExsA ont été utilisées. Les niveaux d'expression et de sécrétion des substrats du SST3 PopB et PcrV ont été analysés par Western blot.



**Figure 54 : Expression (dans les extraits bactériens) et sécrétion (dans les surnageants) des translocateurs hydrophobe et hydrophile PopB et PcrV du SST3 des souches de *P. aeruginosa* sauvage (CHA), dépourvue de *exsB* ( $\Delta exsB$ ) et complémentée ( $\Delta exsB/exsB$ ), surexprimant l'activateur du SST3, ExsA (+*exsA*)**

En l'absence de ExsB, la diminution de la sécrétion des protéines du SST3, observée dans la partie II-C est confirmée (Figure 51), aussi bien pour PopB que pour PcrV. Comme précédemment, cette diminution de sécrétion est couplée à une accumulation intracellulaire de ces protéines.

Grâce à l'utilisation du plasmide permettant de restaurer des niveaux d'expression de l'activateur ExsA similaires dans toutes les souches, les protéines PopB et PcrV sont produites et sécrétées à des niveaux identiques dans la souche sauvage et dans la souche complémentée.

Finalement, la délétion de *exsB* ne conduit pas à des défauts dans la biosynthèse des protéines du SST3 mais entraîne un défaut de sécrétion du SST3. Ce défaut de sécrétion pourrait être dû

à un assemblage incorrect du système. Cependant l'effet de ExsB sur le SST3 a été analysé seulement *in vitro*, en activant le système de façon artificielle en l'absence de cellules eucaryotes. Ces conditions ont permis de découvrir des pistes quant au rôle de ExsB, mais sont très différentes des conditions dans lesquelles le SST3 est activé naturellement, par contact avec ses cellules cibles. Il est donc important d'étudier le rôle de ExsB sur l'activité du SST3 lors d'infections de cellules eucaryotes.

#### **F. Effets de ExsB sur l'activité du SST3 dans des modèles d'infection de cultures cellulaires**

Afin de confirmer l'implication de ExsB dans l'activité du SST3 observée *in vitro*, différents tests d'infection ont été réalisés *in vivo* sur des cellules eucaryotes, cibles naturelles du SST3 de *P. aeruginosa*. Les premières expériences ont permis d'étudier l'effet de ExsB sur la cytotoxicité dépendant du SST3 envers différents types de cellules eucaryotes. Pour aller plus loin, l'injection des effecteurs du SST3 par *P. aeruginosa* dans le cytoplasme des cellules cibles a été étudiée, en présence ou en absence de ExsB.

##### *1) Cytotoxicité dépendant du SST3 sur les cellules eucaryotes*

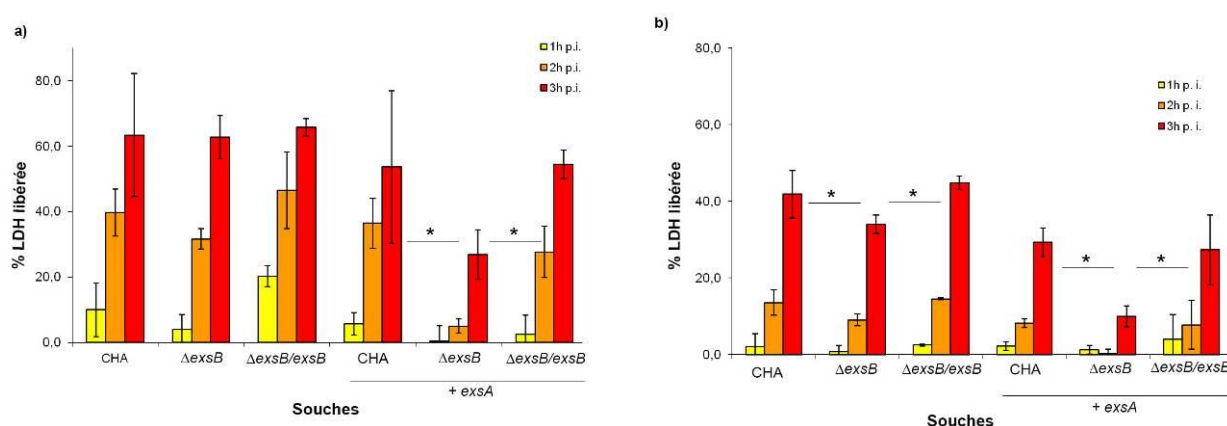
Pour mesurer les conséquences de la délétion de *exsB* sur l'activité du SST3, des tests de cytotoxicité ont été réalisés sur différents types de cellules eucaryotes. Tous ces tests sont basés sur l'effet cytotoxique du SST3 sur les cellules hôtes.

##### **- Cytotoxicité envers les macrophages de souris**

Le premier test a été réalisé sur des macrophages de souris J774. L'infection de ces cellules par des souches de *P. aeruginosa* possédant un SST3 actif conduit rapidement à leur lyse et donc à la libération de Lactate DesHydrogénase (LDH) intracellulaire dans le milieu. Par contre, les bactéries ayant un SST3 inactif ne peuvent pas sécréter le translocon et la LDH n'est pas détectée dans le surnageant d'infection.

Le test a tout d'abord été réalisé en appliquant une multiplicité d'infection (MOI) de 10, c'est-à-dire un rapport de 10 bactéries pour 1 cellule, conditions habituellement utilisées au laboratoire. Aucune différence de cytotoxicité n'a été remarquée entre les différentes souches (résultats non montrés). Cependant, l'utilisation d'une trop forte charge bactérienne par rapport à la quantité de cellules n'est pas représentative des conditions réelles d'infection.

De plus, elle pourrait masquer des différences de cytotoxicité plus subtiles entre les différentes souches de *P. aeruginosa*. Cela avait déjà été constaté lors de l'étude du rôle de l'activité des domaines enzymatiques des exotoxines ExoS et ExoT, puisque des différences de cytotoxicité étaient estompées lorsque de trop grandes quantités de bactéries étaient utilisées (Sun et al. 2012).



**Figure 55 : Cytotoxicité des différentes souches de *P. aeruginosa* sur des macrophages de souris**  
*Cytotoxicité de *P. aeruginosa* sauvage (CHA), déletée de *exsB* ( $\Delta exsB$ ) et complétée ( $\Delta exsB/exsB$ ), avec ou sans le plasmide de surexpression de l'activateur ExsA (+*exsA*) sur des macrophages de souris. L'astérisque représente une différence significative de cytotoxicité entre les souches, d'après le test de Student.*

*a) Pourcentage de LDH intracellulaire libérée après 1h, 2h et 3h d'infection à une multiplicité d'infection (MOI) de 1*

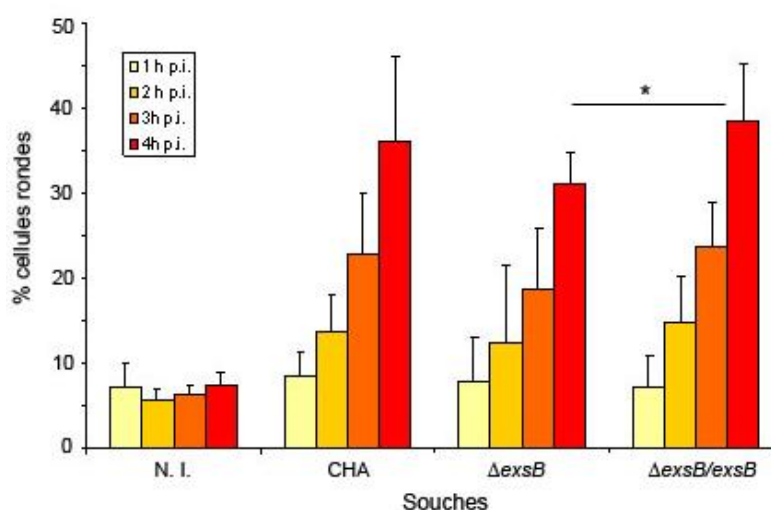
*b) Pourcentage de LDH intracellulaire libérée après 1h, 2h et 3h d'infection à une MOI de 0,2*

Le test de cytotoxicité a donc ensuite été réalisé à des multiplicités d'infection plus faibles, de 1 et 0,2 (Figure 55). Le pourcentage de LDH intracellulaire dans le surnageant d'infection de la souche mutante est très légèrement plus faible que dans ceux des souches sauvage et complétée. Ce test est extrêmement sensible, et la différence de cytotoxicité entre les bactéries sauvages et dépourvues de *exsB* pourrait être masquée par la différence d'expression de l'activateur du SST3, ExsA.

C'est pourquoi, afin de mieux percevoir les différences de cytotoxicité, les souches surexprimant ExsA ont été utilisées. La diminution de cytotoxicité constatée en l'absence de ExsB est alors confirmée et elle est significative ( $p\text{-value} < 0,05$  par le test de Student). L'absence de ExsB cause donc une diminution de la cytotoxicité dépendante du SST3 envers les macrophages.

### - Cytotoxicité envers les cellules épithéliales A549

Afin de confirmer l'implication de ExsB dans la cytotoxicité dépendante du SST3, un autre test a été réalisé sur des cellules épithéliales de poumon A549. Le choix de cette lignée cellulaire est d'autant plus approprié que *P. aeruginosa* infecte souvent les poumons des patients hospitalisés. L'injection de toxines du SST3 par ce microorganisme conduit à une désorganisation du cytosquelette d'actine et à un arrondissement des cellules épithéliales infectées. Le pourcentage de cellules rondes au cours des 4 heures d'infection traduit donc la cytotoxicité causée par le SST3 des bactéries.



**Figure 56 : Cytotoxicité des différentes souches de *P. aeruginosa* sur des cellules épithéliales de poumon.**

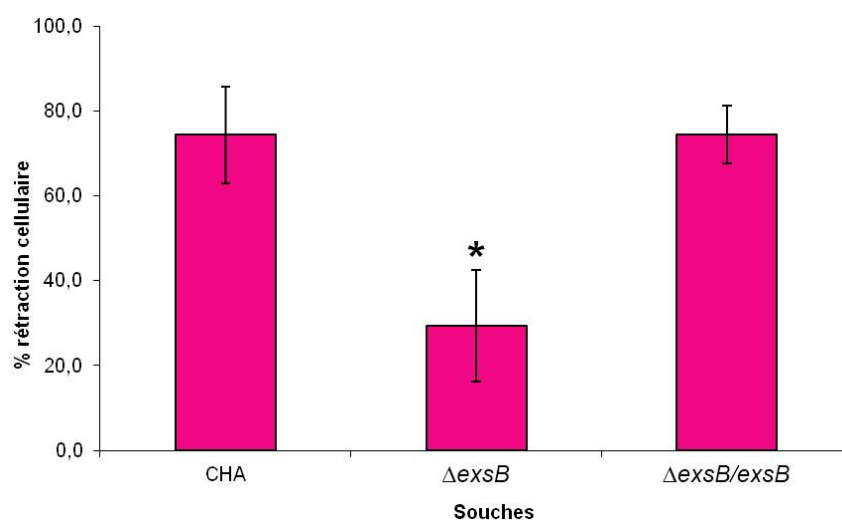
*Pourcentage de cellules épithéliales arrondies après 1h, 2h, 3h et 4h d'infection à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,2 par *P. aeruginosa* sauvage (CHA), délétée de *exsB* ( $\Delta exsB$ ) et complétée ( $\Delta exsB/exsB$ ). L'astérisque représente une différence significative de cytotoxicité entre les souches, d'après le test de Student.*

Sur la Figure 56, la cytotoxicité dépendant du SST3 envers les cellules épithéliales est plus faible lorsque les bactéries n'expriment pas ExsB. Cette différence de cytotoxicité est très faible mais est tout de même significative après 4 heures d'infection (p-value < 0,05 d'après le test de Student). Ces résultats permettent de confirmer la diminution de cytotoxicité en l'absence de ExsB.

### - Cytotoxicité envers les cellules endothéliales

Un dernier test de cytotoxicité a été réalisé en collaboration avec Philippe Huber et Stéphanie Bouillot sur une culture primaire de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC). L'utilisation d'une culture primaire de cellules eucaryotes humaines est pertinente puisque les cellules sont prélevées directement des cordons ombilicaux et ne sont

pas immortalisées contrairement aux lignées cellulaires. Elles sont donc plus proches des cellules rencontrées *in vivo*. De plus, les cellules endothéliales pourraient constituer une cible de la bactérie *P. aeruginosa*, notamment lors de septicémies. L'infection des HUVEC par des souches de *P. aeruginosa* possédant un SST3 actif aboutit à une rétraction des cellules eucaryotes. Le pourcentage de rétraction des cellules a été déterminé après infection par la souche sauvage, la souche mutante délétée de *exsB* et la souche complémentée.



**Figure 57 : Cytotoxicité des différentes souches de *P. aeruginosa* sur des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine.**

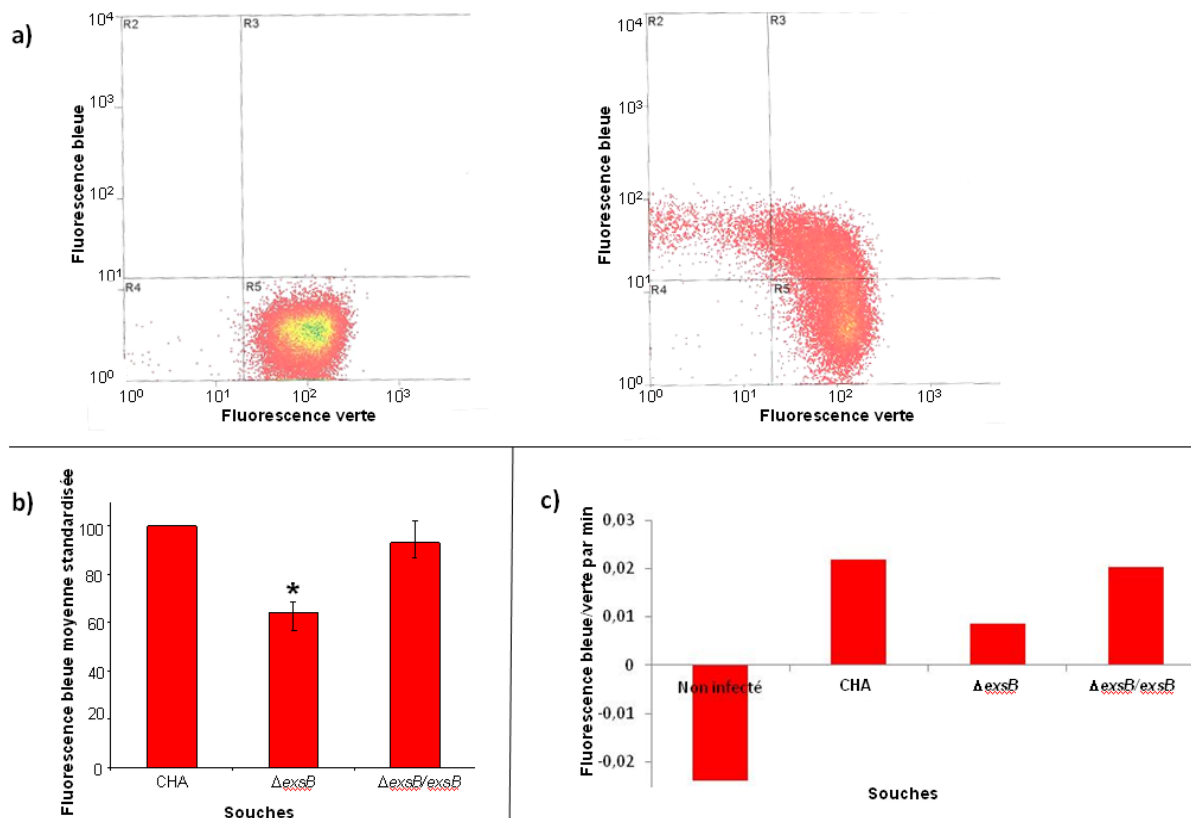
*Pourcentage de rétraction cellulaire après 1h, 2h et 3h d'infection à une multiplicité d'infection (MOI) de 1 par *P. aeruginosa* sauvage (CHA), délétée de *exsB* ( $\Delta exsB$ ) et complémentée ( $\Delta exsB/exsB$ ). L'astérisque indique que la différence de cytotoxicité entre la souche  $\Delta exsB$  et les souches CHA et  $\Delta exsB/exsB$  est significative ( $p$ -value < 0,05 d'après le test de Student).*

Les résultats de cytotoxicité présentés sur la Figure 57 montrent que lorsque les cellules sont infectées par les bactéries n'exprimant pas ExsB, une diminution de 45% de la rétraction cellulaire est constatée. Cette différence est significative ( $p$ -value < 0,05 par le test de Student) et confirme la baisse de cytotoxicité liée au SST3 en l'absence de ExsB.

En conclusion, les différents tests d'infection réalisés *in vitro* sur des cultures de cellules eucaryotes démontrent l'implication de ExsB dans la cytotoxicité dépendant du SST3, et donc dans l'activité du SST3. La cytotoxicité du SST3 est principalement causée par les toxines qu'il injecte dans le cytoplasme des cellules eucaryotes cibles afin de pirater leurs principales fonctions. La diminution de cytotoxicité en l'absence de ExsB pourrait donc être causée par une diminution de la quantité de toxines du SST3 injectées dans le cytoplasme eucaryote. Cette hypothèse serait en accord avec la diminution de la sécrétion des substrats du SST3 observée *in vitro*. Afin de vérifier cela, l'injection des toxines du SST3 dans le cytoplasme de cellules eucaryotes a été étudiée.

### 2) Taux d'injection de toxines envers les cellules eucaryotes

L'injection de toxines du SST3 dans le cytoplasme de cellules eucaryotes par les souches de *P. aeruginosa* sauvage, mutante et complétée a été analysée. Pour cela, les bactéries ont été modifiées pour exprimer une toxine chimérique ExoS- $\beta$ -lactamase. Après infections de cellules épithéliales ou de lymphocytes B, les cellules sont incubées avec un substrat fluorescent vert pouvant être clivé par la  $\beta$ -lactamase en un produit fluorescent bleu. L'analyse de la fluorescence reflète ainsi l'activité  $\beta$ -lactamase et peut être corrélée avec la quantité de toxine chimérique injectée dans les cellules eucaryotes (Verove et al. 2012).



**Figure 58 : Etude de l'injection de la toxine chimérique ExoS- $\beta$ -lactamase dans le cytoplasme de cellules eucaryotes après infection à une multiplicité d'infection (MOI) de 1 par différentes souches de *P. aeruginosa***

- a) Analyse en cytométrie de flux des cellules de type lymphocytes B, BJAB. A gauche, les cellules seules, non infectées, émettent une fluorescence verte. A droite, les cellules infectées par la souche sauvage exprimant la toxine chimérique émettent une fluorescence bleue.
- b) Fluorescence bleue moyenne normalisée des cellules BJAB après 3h d'infection par les souches de *P. aeruginosa* sauvage (CHA), délétée de *exsB* ( $\Delta exsB$ ) et complétée ( $\Delta exsB/exsB$ ) produisant la toxine chimérique ExoS- $\beta$ -lactamase. L'astérisque représente une différence significative entre les souches, d'après le test de Student ( $p$ -value  $< 0,05$ ).
- c) Analyse sur un fluorimètre en plaques du ratio de fluorescence bleue/verte émise par minute par des cellules épithéliales de poumon, A549, infectées par les souches de *P. aeruginosa* sauvage (CHA), délétée de *exsB* ( $\Delta exsB$ ) et complétée ( $\Delta exsB/exsB$ ) produisant la toxine chimérique ExoS- $\beta$ -lactamase. Le contrôle négatif est constitué des cellules seules, non infectées. Plus la quantité de toxines chimériques injectée dans les cellules cibles est élevée, plus le ratio de fluorescence bleue/verte des cellules augmente au cours du temps.

L'analyse de la fluorescence émise par les lymphocytes B après infection (Figure 58b) révèle une diminution des toxines injectées par la souche bactérienne délétée de *exsB*. De même, l'injection de toxine chimérique dans les cellules épithéliales est plus faible lorsque les bacilles n'expriment pas ExsB. La diminution de quantité de toxine chimérique injectée en l'absence de ExsB dans les cellules eucaryotes est significative (p-value <0,05).

L'utilisation de souches de *P. aeruginosa* produisant la toxine chimérique ExoY- $\beta$ -lactamase a permis de confirmer la diminution de l'injection de toxines du SST3 en l'absence de ExsB (résultats non montrés).

La diminution de l'injection des toxines d'environ 40% n'est pas comparable avec la forte diminution de sécrétion *in vitro* car l'activation du SST3 *in vivo* par le contact avec la cellule cible est très différent de la très forte activation provoquée *in vitro* par la déplétion en calcium.

La diminution de la quantité de toxines injectées dans le cytoplasme eucaryote n'est pas due à une diminution de production des substrats du SST3, comme constaté lors de l'étude de l'effet de ExsB sur l'activité du SST3 *in vitro* (partie II-E de ce chapitre). Elle est donc causée par un défaut de sécrétion des toxines, avec :

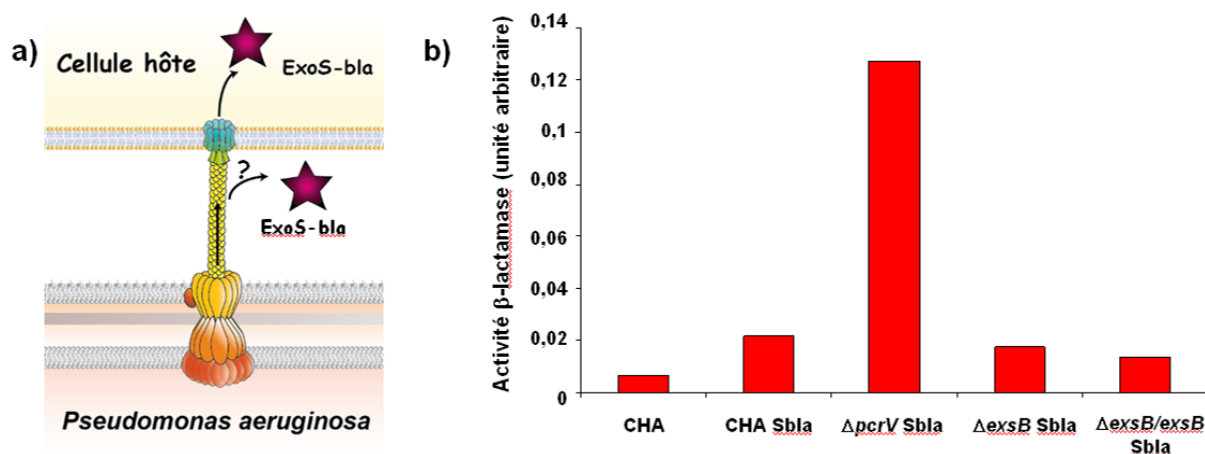
- une diminution de la sécrétion des substrats du SST3
- et/ou une injection non polarisée.

La diminution de la sécrétion des substrats du SST3 lorsque ExsB n'est pas exprimée a déjà été observée *in vitro* (partie II-E). La sécrétion de toxine chimérique ExoS-bla est également fortement réduite en l'absence de ExsB (résultats non montrés). La diminution de sécrétion explique donc, au moins en partie, la diminution de l'injection de toxines dans les cellules cibles. Par contre, il faut déterminer si l'absence de ExsB conduit à un défaut de polarisation de l'injection.

### 3) Polarisation de l'injection

Le contact entre la bactérie et la cellule eucaryote permet l'export des toxines directement dans le cytoplasme de la cellule hôte par le SST3. Dans ce cas, l'injection des toxines est dite polarisée. Au contraire, une injection non polarisée conduirait à la sécrétion des toxines dans le milieu extracellulaire aussi bien que dans le cytoplasme eucaryote (comme illustré par la Figure 59-a ci-dessous). En l'absence de ExsB, la quantité de toxines injectées dans la cellule cible diminue. Afin de déterminer si cette diminution est due à une injection

non polarisée, la présence de toxines dans le surnageant d'infection a été analysée. La détection de toxines dans le milieu extracellulaire repose sur un test colorimétrique. En effet, la dégradation de la nitrocéfine, substrat de couleur jaune, par le domaine  $\beta$ -lactamase de la toxine chimérique ExoS- $\beta$ -lactamase conduit à la formation d'un produit de couleur rouge. Le suivi de l'absorbance reflète donc l'activité enzymatique et est corrélé à la quantité de toxine chimérique présente dans le surnageant d'infection.



**Figure 59 : Etude de la polarisation de l'injection des effecteurs du SST3 par les souches de *P. aeruginosa* produisant la toxine chimérique ExoS- $\beta$ -lactamase lors d'infection de cellules CHO.**

**a) Schéma de la méthode utilisée pour tester la polarisation de l'injection. Une injection non polarisée conduirait à la sécrétion de la toxine chimérique dans le milieu extracellulaire au lieu de directement dans le cytoplasme eucaryote. Le test consiste en le dosage de l'activité  $\beta$ -lactamase dans le milieu extracellulaire après 3h d'infection.**

**b) Activité la  $\beta$ -lactamase dans les surnageants d'infection de cellules CHO par la souche bactérienne sauvage (CHA), ou les souches de *P. aeruginosa* exprimant la toxine chimérique ExoS- $\beta$ -lactamase (Sbla), sauvage (CHA Sbla), délétée du gène codant pour la protéine de pointe PcrV ( $\Delta pcrV$  Sbla), délétée de *exsB* ( $\Delta exsB$  Sbla) et complémentée ( $\Delta exsB/exsB$  Sbla)**

La souche sauvage délétée de *pcrV*, gène codant pour la protéine de pointe du SST3, est utilisée comme contrôle positif puisqu'elle est connue pour exporter la totalité des toxines dans le milieu extracellulaire. Les résultats obtenus (Figure 59) montrent qu'un très faible niveau d'activité  $\beta$ -lactamase est détecté dans les surnageants d'infection de la souche sauvage, tout comme les souches délétée de *exsB* et complémentée. Cela signifie que les toxines sont injectées par le SST3 directement dans le cytoplasme des cellules eucaryotes, y compris en l'absence de ExsB. La détection d'un niveau basal d'activité  $\beta$ -lactamase est probablement liée à la lyse de quelques bactéries ou des cellules infectées.



En conclusion, le défaut d'injection des toxines dans les cellules eucaryotes, constaté en l'absence de ExsB, n'est pas dû à une injection non polarisée mais seulement à une diminution de la quantité de protéines sécrétées par le SST3.

Les souches de *P. aeruginosa* dépourvues de *exsB* présentent un défaut de sécrétion des substrats du SST3. En conséquence, elles ont une activité cytotoxique envers les cellules cibles eucaryotes atténuée, et finalement une virulence envers les animaux atténuée. Pour aller plus loin, les causes moléculaires de ce défaut de sécrétion ont été recherchées en examinant l'assemblage de la machinerie du SST3.

### **G. Rôle de ExsB dans l'assemblage du SST3**

Comme suggéré par l'étude de l'activité du SST3 des souches dépourvues de ExsB, cette protéine pourrait être impliquée dans l'assemblage du système. Etant donné sa localisation dans la bactérie et ses homologues avec la pilotine de *Yersinia spp.*, ExsB pourrait être une pilotine du SST3 et participer à l'assemblage de l'anneau de sécrétine dans la membrane externe de la bactérie.

#### *1) Evaluation du nombre d'aiguilles du SST3 assemblées*

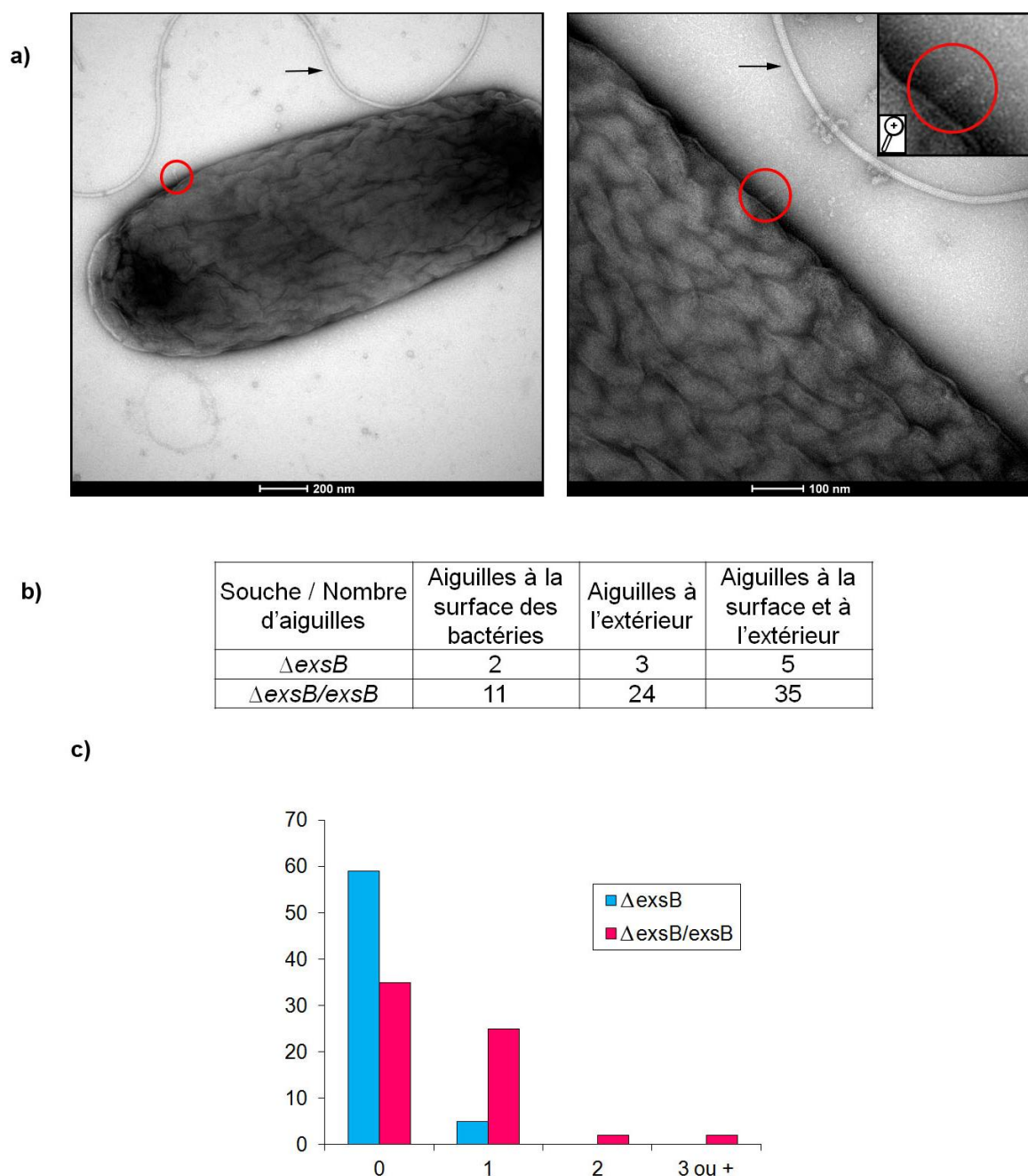
Si la protéine ExsB est impliquée dans l'assemblage du SST3, alors son absence devrait conduire à une diminution du nombre d'aiguilles du SST3 produites par les bactéries.

Une méthode permettant de visualiser et de dénombrer les aiguilles du SST3 est la microscopie électronique.

Pour chacune des souches, délétée de *exsB* et complémentée, 60 clichés ont été réalisés et analysés, à l'université de Bristol, dans l'équipe de Ariel Blocker.

Les aiguilles du SST3 ont été identifiées par leur taille d'environ 70 nm de long et 6,5 nm de large puis comptées. Les complexes de pointe, à l'extrémité de l'aiguille, ont également pu être observés. Certaines aiguilles étaient présentes à la surface des bactéries. Dans ce cas, seules les aiguilles présentes sur le plan équatorial ont été visualisées. D'autres ont été observées dans le milieu extracellulaire car les aiguilles, fragiles, se détachent parfois des bactéries. En effet, le simple fait de vortexer quelques minutes une suspension bactérienne de

*P. aeruginosa* permet de détacher complètement les aiguilles du SST3, technique utilisée pour les purifier (Pastor et al. 2005).



**Figure 60 : Analyse du nombre d'aiguilles du SST3 assemblées par les souches de *P. aeruginosa* délétées de *exsB* ( $\Delta exsB$ ) et complémentées ( $\Delta exsB/exsB$ ), dans des conditions d'induction du SST3.**

a) Clichés de microscopie électronique d'une bactérie à la surface de laquelle est assemblée une aiguille du SST3, entourée en rouge. L'aiguille du SST3 est reconnaissable par sa taille, d'environ 70nm de long et 6,5nm de diamètre. Le flagelle polaire de la bactérie est également observé et est indiqué par une flèche.

b) Analyse du nombre d'aiguilles confirmées du SST3 à la surface des bactéries ou bien détachées dans le milieu extracellulaire pour les deux souches de *P. aeruginosa*. Soixante clichés de microscopie électronique ont été analysés pour chaque souche.

c) Distribution du nombre de bactéries possédant 0, 1, 2 ou 3 et plus aiguilles confirmées du SST3 à leur surface ou dans le milieu extracellulaire.

Une diminution significative du nombre d'aiguilles totales présentes sur les clichés des bactéries  $\Delta exsB$  est observée (Figure 60) par rapport aux bactéries exprimant ExsB. En effet, en l'absence de ExsB, le nombre d'aiguilles assemblées à la surface des bactéries aussi bien que détachées dans le milieu extracellulaire est plus faible. Une analyse statistique par le test Mann & Whitney a permis de montrer que cette différence est significative (p-value inférieure à 0,05).

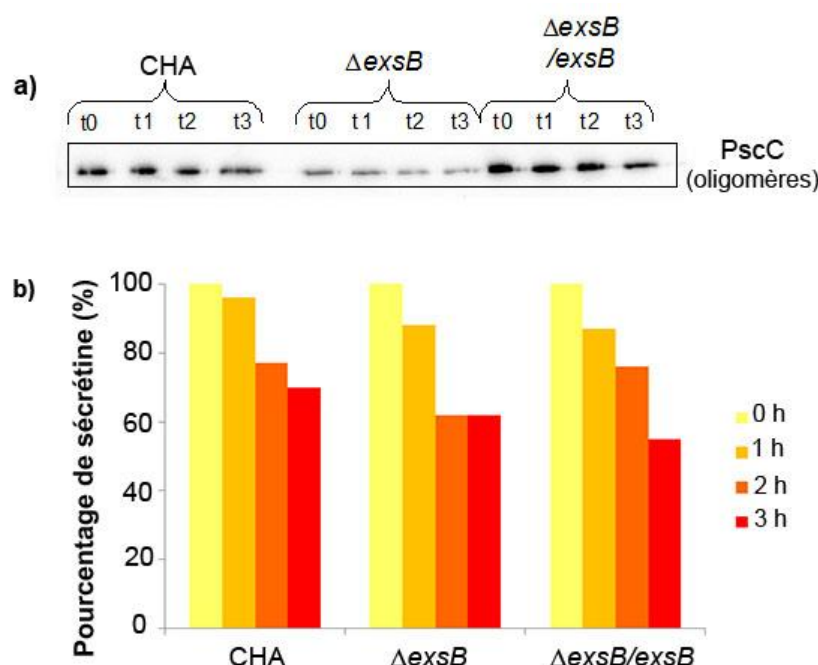
La protéine ExsB a donc effectivement un rôle dans l'assemblage du SST3. Elle pourrait être la pilotine de la sécrétine PscC, c'est à dire participer à l'assemblage de cette protéine indispensable à l'activité du SST3. Plus précisément, les pilotines ont généralement un rôle dans la stabilisation, l'oligomérisation, et/ou la localisation de leur sécrétine dans la membrane externe.

Afin de déterminer si la protéine ExsB est la pilotine de la sécrétine PscC, les effets de la délétion de ExsB sur la stabilité, l'oligomérisation et la localisation de PscC ont été étudiés.

## 2) Effet de ExsB sur la stabilisation de la sécrétine

La stabilité de la sécrétine PscC a été analysée dans les souches de *P. aeruginosa* exprimant ou non ExsB. Pour cela, la quantité de sécrétine a été analysée par Western blot au moment du blocage par le chloramphénicol de la biosynthèse des protéines puis au bout de 1h, 2h et 3h de ce blocage en maintenant les bactéries en culture sous conditions inductrices du SST3 (Figure 61).

Les oligomères de sécrétine sont très résistants et ne sont pas dénaturés par la chaleur ni par la présence d'agent dénaturant lors de l'analyse par SDS PAGE (Burghout et al. 2004). D'un poids moléculaire de près de 1000 kDa, ils peuvent tout de même être détectés par Western blot dans des conditions particulières (gels d'électrophorèse à faible pourcentage d'acrylamide, transfert de longue durée sur membrane PVDF).



**Figure 61 : Analyse de la stabilité des oligomères de sécrétine PscC dans les souches de *P. aeruginosa* sauvage (CHA), délétée de *exsB* ( $\Delta exsB$ ) et complétée ( $\Delta exsB/exsB$ ).**

**a) Les extraits bactériens sont analysés par immunoblot au bout de 0, 1h, 2h et 3h après le blocage de la biosynthèse des protéines par le chloramphénicol.**

**b) Pourcentage d'oligomères de sécrétine comparé indépendamment pour chacune des souches après 0h (100% d'oligomères), 1h, 2h et 3h de blocage au chloramphénicol. Ces pourcentages ont été déterminés en calculant la quantité relative de protéine PscC aux temps 1, 2 et 3h par rapport au temps 0.**

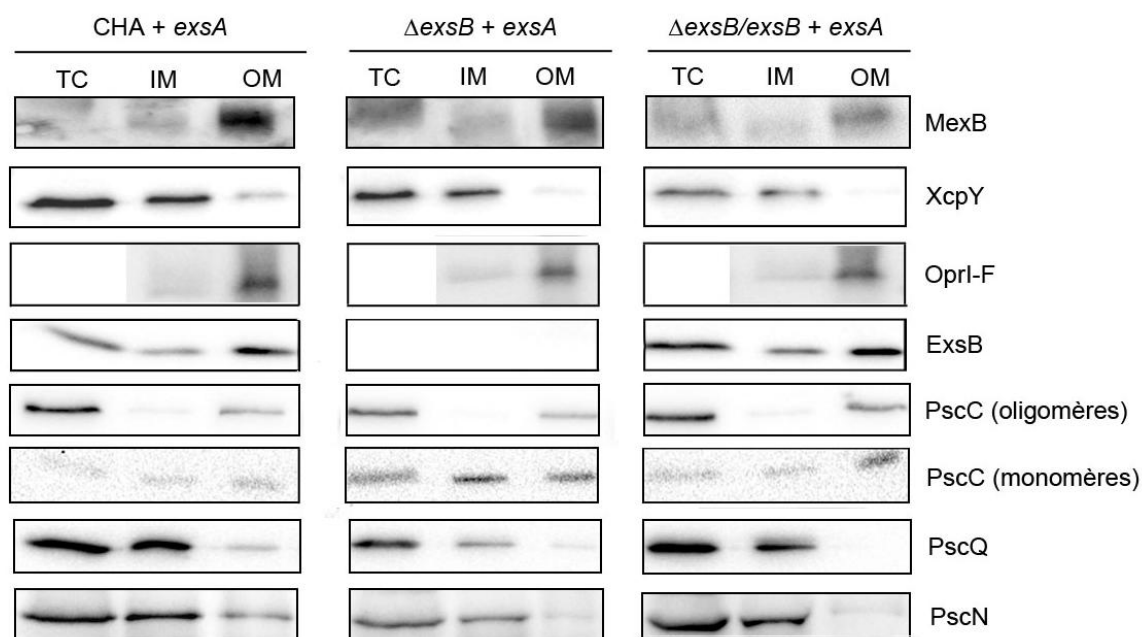
Aucun effet visible de stabilisation de PscC par ExsB n'est observé. Pour toutes les souches, la quantité d'oligomères a diminué d'environ 40% en 3h par rapport à la quantité initiale. Néanmoins, une diminution très nette de la quantité initiale d'oligomères de sécrétine est constatée en l'absence de ExsB.

Une hypothèse expliquant cette diminution serait que la sécrétine mal assemblée du fait de l'absence de ExsB serait immédiatement dégradée. Par contre, la petite proportion de sécrétine correctement assemblée serait stable.

### 3) Effet de ExsB sur l'oligomérisation et la localisation de la sécrétine

Le rôle des pilotines peut être de participer à l'oligomérisation et la localisation de la sécrétine. C'est pourquoi la localisation de la sécrétine PscC a été étudiée dans les différentes souches.

Une première méthode de séparation des membranes interne et externe de *P. aeruginosa* a été appliquée aux différentes souches, basée sur la **solubilisation différentielle par des détergents**. Les fractions obtenues ont été analysées par Western blot (Figure 62).



**Figure 62 : Séparation des membranes interne et externe par des détergents**  
*Séparation des membranes par des détergents pour les souches de *P. aeruginosa* sauvage (CHA), délétée de *exsB* ( $\Delta$ exsB) et complétée ( $\Delta$ exsB/exsB), surexprimant l'activateur du SST3, *ExsA* (+exsA). Pour chaque souche, les extraits bactériens totaux (TC) ainsi que les fractions de membrane interne et externe (IM et OM respectivement) sont analysés par Western blot. Les protéines *XcpY* et *MexB* sont des composants connus de la membrane interne et *OprI-F* de la membrane externe et sont utilisées comme contrôles.*

Les contrôles de séparation de membranes interne et externe sont XcpY et MexB. La protéine XcpY est l'un des composants de la membrane interne du Système de Sécrétion de Type II (Durand et al. 2003). La protéine MexB, appartenant à un système de pompe à efflux, est elle aussi localisée dans la membrane interne (Poole et al. 1993). De façon surprenante, les résultats obtenus montrent que MexB se retrouve dans les fractions de membrane externe. Cela est peut-être dû au fait que le sarkosyl ne solubilise pas correctement cette protéine MexB mais solubilise efficacement XcpY. Ces deux protéines possèdent en effet d'importantes différences de topologie. XcpY présente un seul segment transmembranaire au lieu de douze pour MexB (Bleves et al. 1996 ; Guan et al. 1999). Cette différence de localisation montre la nécessité d'utiliser une autre technique pour la séparation des membranes. Les porines OprI-F sont des protéines contrôle de la membrane externe et sont bien retrouvées dans les fractions attendues pour toutes les souches.

La localisation de différentes protéines du SST3 a ensuite été vérifiée :

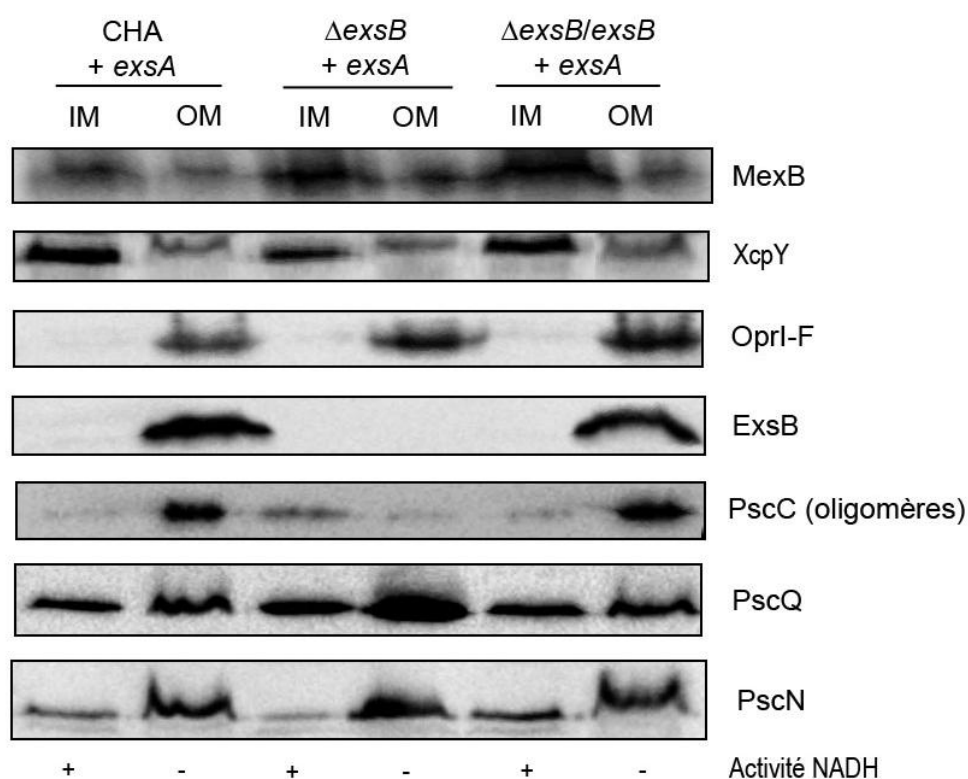
- La protéine ExsB est bien présente majoritairement dans la membrane externe des souches sauvage et complémentée, bien qu'une petite proportion soit également détectée dans la membrane interne. Cette petite quantité de protéine dans la membrane cytoplasmique n'est pas surprenante puisque ExsB est une lipoprotéine et transite par la membrane interne avant d'être ancrée dans la membrane externe.
- La protéine PscQ constitue l'anneau cytoplasmique du SST3. Dans toutes les souches, PscQ est détectée dans la fraction de la membrane interne, du fait des fortes interactions avec les composants de la membrane interne du SST3.
- De même, l'ATPase PscN, enzyme orientée vers le compartiment cytoplasmique, majoritairement présente dans les fractions membranaires comme expliqué dans la partie sur l'ATPase, est retrouvée dans les fractions de membrane interne.
- Enfin, la sécrétine PscC peut être détectée sous différentes forme. Les oligomères de sécrétine, d'environ 1000 kDa sont localisés dans la membrane externe de toutes les souches de *P. aeruginosa*, y compris de la souche délétée de *exsB*. Par contre, comme pour les résultats obtenus sur la stabilité de PscC, la nette diminution de quantité d'oligomères de sécrétine en l'absence de ExsB est confirmée. Les monomères de sécrétine, d'environ 64 kDa, sont détectés majoritairement dans la membrane externe des souches sauvage et complémentée. Pour la souche délétée de *exsB*, les monomères de sécrétine sont plutôt situés dans la membrane interne. De plus, une légère augmentation de la quantité de monomères de PscC est observée.

Ces résultats montrent que ExsB semble jouer un rôle dans l'oligomérisation de la sécrétine. Un modèle d'action de ExsB pourrait être que cette lipoprotéine, peut-être avec l'aide d'une autre protéine, prend en charge les monomères de sécrétine pour favoriser leur oligomérisation. Enfin, la diminution de la quantité de PscC oligomérique se traduit par une diminution de la quantité des autres protéines du SST3 (Figure 62). Cette observation est peut-être due à une dégradation des protéines du SST3 lorsqu'elles n'ont pas leurs partenaires, dont les anneaux de sécrétine.

Cela est particulièrement cohérent lorsque les différents modèles de hiérarchie d'assemblage du SST3 sont pris en compte, car ils suggèrent tous que la sécrétine est l'un des premiers composants du SST3 à être mis en place (Diepold et al. 2010).

Afin de confirmer ces résultats, une nouvelle méthode de séparation a été utilisée. Il est apparu très important d'utiliser une deuxième technique puisque la première a montré quelques limites, notamment pour les protéines de la membrane interne possédant de

nombreux segments transmembranaires. Il est donc possible qu'un effet de ExsB sur la localisation de PscC ait été masqué. La seconde méthode de séparation utilisée repose sur la séparation des membranes interne et externe en fonction de leur densité, grâce à un **gradient de saccharose** (comme expliqué dans la partie Matériels et Méthodes). Les fractions de membrane interne et externe ont été identifiées par coloration au bleu de Coomassie pour visualiser les porines de la membrane externe et par activité NADH oxydase de la membrane interne. La suite de l'analyse a été effectuée par Western blot sur une seule fraction représentative de chaque membrane.



**Figure 63 : Séparation des membranes interne et externe par gradient de saccharose**  
*Séparation des membranes par gradient de saccharose pour les souches de *P. aeruginosa* sauvage (CHA), délétée de *exsB* ( $\Delta exsB$ ) et complétée ( $\Delta exsB/exsB$ ), surexprimant l'activateur du SST3, *ExsA* (+*exsA*). Les fractions de membrane interne et externe (IM et OM respectivement) de chaque souche sont analysées par immunoblot. Les protéines *XcpY* et *MexB* sont des composants connus de la membrane interne tandis que *OprI-F* sont des porines de la membrane externe. Ces protéines sont utilisées comme contrôles.*

L'analyse des fractions issues du gradient de saccharose (Figure 63) montre que toutes les protéines contrôles : *XcpY*, *MexB* et *OprI-F* sont localisées dans les membranes interne et externe respectivement, comme attendu. Avec cette méthode, la protéine *MexB* est localisée dans la bonne fraction, elle semble donc plus appropriée que la technique précédente de séparation des membranes par les détergents. La protéine *ExsB* est clairement localisée dans la membrane externe des bactéries exprimant le gène correspondant. Par contre, les protéines

PscQ et PscN, qui devraient être retrouvées dans les fractions de membrane interne, sont détectées pour toutes les souches au niveau des deux membranes. Parfois même il semble y avoir une plus grande quantité de ces protéines dans la membrane externe que dans la membrane cytoplasmique. Il est intéressant de noter que le signal des protéines PscQ et PscN dans la membrane externe est toujours flou et étalé, ce qui traduit une mauvaise migration des protéines. Cela pourrait être dû à une surcharge en protéines dans le gel. Ces résultats aberrants indiquent que la technique de séparation des membranes par gradient de saccharose peut présenter des artefacts pour les protéines associées aux membranes mais ne possédant aucun segment transmembranaire.

Enfin, les oligomères de sécrétine sont correctement détectés dans la membrane externe des souches de *P. aeruginosa* sauvage et complémentée. En l'absence de ExsB par contre, outre la diminution de quantité des oligomères de sécrétine, une modification de leur localisation est constatée. En effet, ils se trouvent dans les deux membranes, avec une nette majorité dans la membrane interne. Ces résultats sont très intéressants puisque le comportement de la sécrétine est différent en l'absence de ExsB. Ils suggèrent une implication de ExsB dans la localisation de PscC. La quantité des monomères de sécrétine est beaucoup plus faible que celle d'oligomères, rendant leur détection plus délicate. Cependant, ils présentent apparemment le même profil de localisation que les oligomères (résultats non montrés). La mauvaise localisation des monomères de sécrétine en l'absence de ExsB, observée lors de la séparation des membranes par les détergents, est donc confirmée.

Bien que les deux techniques utilisées pour séparer les membranes interne et externe des bactéries soient imparfaites, tous les résultats convergent vers un rôle de la protéine ExsB dans l'assemblage et la localisation de la sécrétine dans la membrane externe.

En considérant les résultats obtenus avec la méthode de séparation des membranes par des détergents, ce défaut d'assemblage dans le mutant  $\Delta exsB$  se répercute ensuite sur la mise en place de tous les composants du SST3.

Afin de savoir si l'effet de la protéine ExsB sur la sécrétine PscC est direct ou indirect, des expériences ont été réalisées pour déterminer si ces deux protéines co-localisent et si elles interagissent.

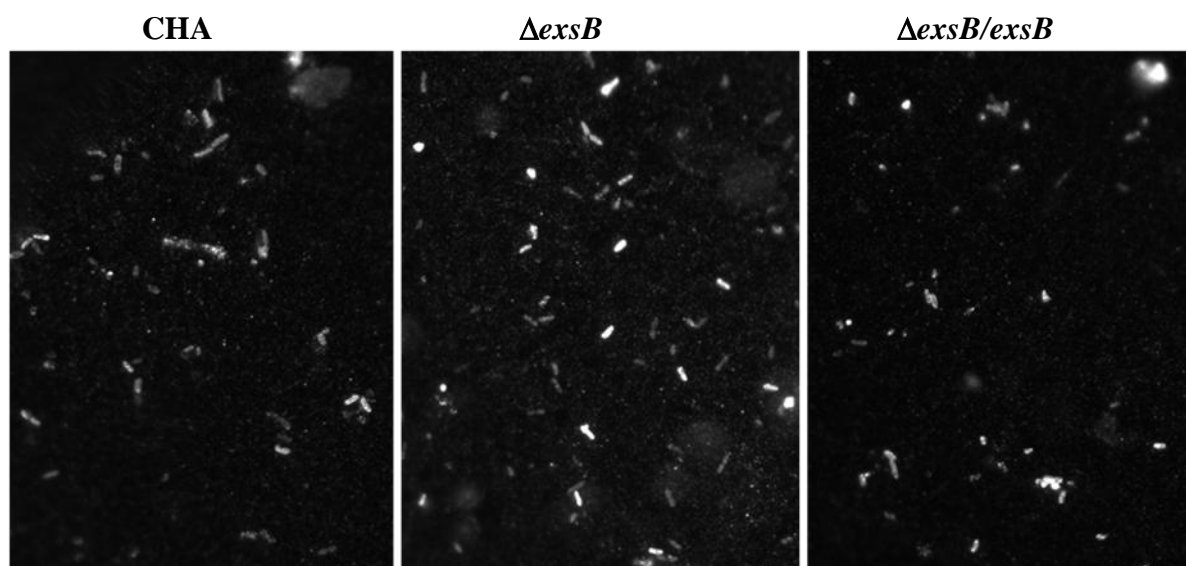


#### 4) Recherche de colocalisation entre la protéine ExsB et la sécrétine PscC

Après avoir étudié précédemment la localisation générale des protéines ExsB et PscC, toutes deux situées dans la membrane externe, l'objectif était de savoir si les deux protéines co-localisent, c'est-à-dire si elles s'assemblent en un même endroit de la membrane externe. La méthode utilisée pour répondre à cet objectif a été de marquer spécifiquement chaque protéine par fluorescence. Ensuite, une observation microscopique devrait permettre de déterminer si les spots fluorescents correspondant à chacune des protéines se superposent.

La première technique utilisée a été l'**immunomarquage**. Après fixation des bactéries à une lame, les protéines ExsB et PscC sont reconnues par leurs anticorps spécifiques et un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome permet leur marquage fluorescent. Les premiers résultats ont été peu satisfaisants. Peu de bactéries étaient fixées à la lame, une faible proportion de bactéries était marquée, il y avait beaucoup de bruit de fond, et un signal non spécifique puisque les bactéries délétées de *exsB* présentaient aussi un signal fluorescent. C'est pourquoi de nombreuses tentatives d'optimisation ont été effectuées. Les conditions de fixation et de perméabilisation ont été améliorées, en modifiant les supports de fixation, les solvants utilisés, les concentrations et les temps d'incubation. Ces nouvelles conditions expérimentales ont permis d'observer un plus grand nombre de bactéries marquées, mais le résultat est resté décevant avec un marquage non spécifique des bactéries  $\Delta exsB$ .

Nous avons pu constater que les conditions optimales de fixation et de perméabilisation sont très différentes selon les souches de *P. aeruginosa* utilisées. La souche CHA, utilisée pour l'étude des protéines PscN et ExsB du SST3, se fixe et se perméabilise beaucoup plus difficilement que la souche PAO1. Ceci peut être dû à la production conséquente d'alginate extracellulaires par la souche CHA, qui constitueraient une matrice protectrice autour de la bactérie. Des essais ont aussi été réalisés pour améliorer la spécificité du signal en épuisant au préalable les anticorps primaires dirigés contre ExsB par différents moyens. Les anticorps ont par exemple été épuisés sur une membrane de nitrocellulose sur laquelle avait été transféré un extrait de bactéries mutantes  $\Delta exsB$ , ou bien par incubation avec une poudre acétonique de ces mêmes bactéries. L'épuisement des anticorps n'a pas été suffisant pour permettre d'éliminer le signal non spécifique. C'est pourquoi les anticorps dirigés contre ExsB ont été purifiés à l'aide de la protéine recombinante MBP-ExsB. Malgré l'utilisation de ces anticorps dirigés contre ExsB purifiés, les résultats obtenus n'ont pas été satisfaisants, puisqu'un signal est observé y compris en l'absence de ExsB dans les bactéries (Figure 64).



**Figure 64 : Clichés de microscopie à fluorescence verte (x100) des différentes souches de *P. aeruginosa***

*La fluorescence verte observée correspond au signal obtenu lors du marquage des bactéries sauvage (CHA), délétée de exsB ( $\Delta exsB$ ) et complétée ( $\Delta exsB/exsB$ ) avec l'anticorps dirigé contre ExsB purifié par affinité.*

Une seconde méthode a été utilisée pour le marquage fluorescent de ExsB et de PscC. Ces deux protéines ont été fusionnées avec des **étiquettes fluorescentes** rouge (mCherry) et verte (sfGFP). Malheureusement, ces protéines chimériques n'ont pu être exprimées correctement par *P. aeruginosa* dans des conditions permettant l'étude de leur colocalisation. La protéine ExsB-mCherry est correctement exprimée à partir du plasmide pJN105 par induction à 0,2% d'arabinose puisque les observations par microscopie à épifluorescence ont montré un marquage rouge périphérique des bactéries. Cependant, l'induction de l'expression de ExsB ne peut être finement contrôlée du fait d'une fuite du promoteur, qui conduit à une synthèse de la protéine même en l'absence d'arabinose. De plus, comme expliqué dans la partie II-A.3) du chapitre Résultats et discussion, l'expression plasmidique de ExsB conduit à une trop forte surexpression de la protéine. C'est pourquoi nous avons décidé de transférer le gène codant pour la protéine chimérique dans le chromosome de *P. aeruginosa*. Malheureusement, cette nouvelle construction n'est pas fonctionnelle, probablement à cause de l'apparition d'une structure secondaire au niveau du RBS, détectée lors du séquençage et qui empêche certainement la liaison du ribosome à l'ADN. De plus, le produit du gène pscC-sfGFP, cloné dans le plasmide pJN105, n'a pu être visualisé par fluorescence. Un contrôle de l'expression de la protéine de fusion PscC sfGFP par la souche de *P. aeruginosa* délétée de *pscC* a permis de confirmer l'absence d'expression (résultats non montrés). Ce défaut peut être dû à l'apparition d'une structure secondaire à la fin de la séquence d'ADN codante,

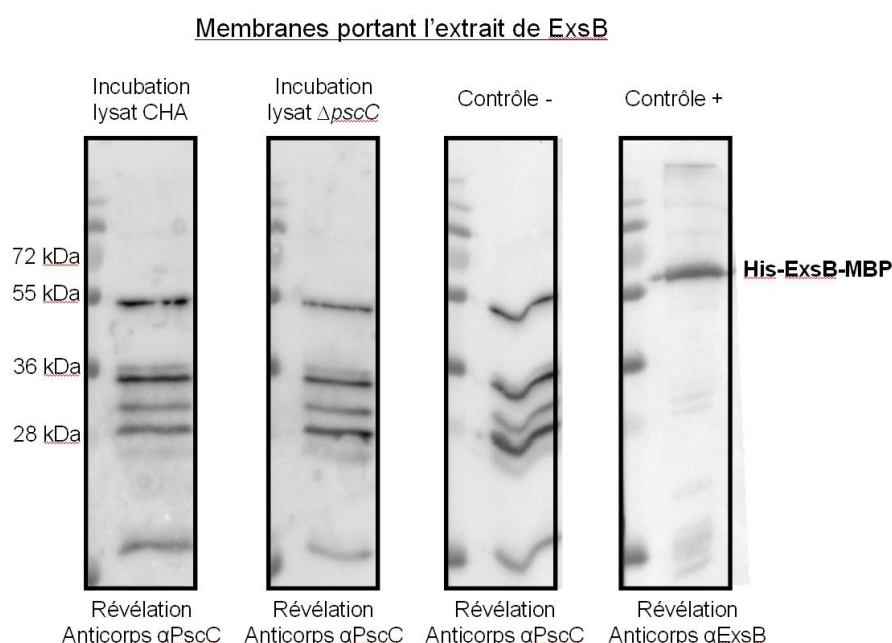
comme indiqué lors du séquençage, ou bien à une trop grande instabilité de la protéine de fusion.

Malgré les différentes stratégies mises en œuvre, nous n'avons pas pu vérifier que les protéines ExsB et PscC co-localisent sur le lieu d'assemblage du SST3

### 5) Recherche d'interaction entre ExsB et la sécrétine PscC

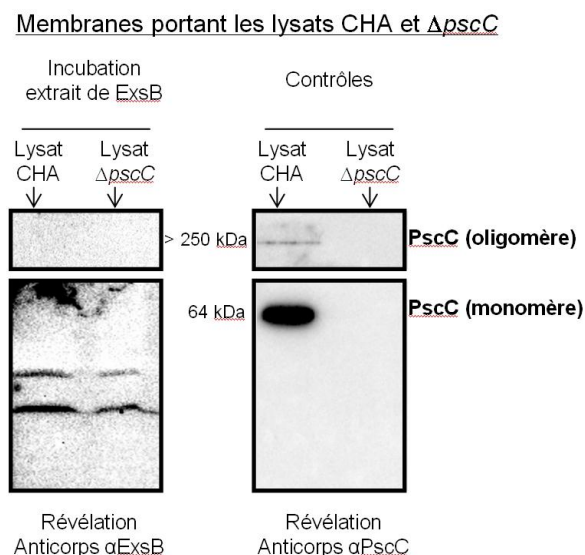
L'effet de ExsB sur la sécrétine pourrait être direct, via une interaction entre ces deux protéines, ou bien indirect en impliquant d'autres partenaires, comme par exemple des protéines composant la base du SST3. C'est pourquoi plusieurs méthodologies ont été développées afin d'étudier les partenaires de ExsB.

La méthode de l'**overlay** ou **Far Western blot** a été employée pour essayer de détecter une interaction entre ExsB et la sécrétine PscC. Dans une première expérience, des lysats de *P. aeruginosa* sauvage ou délétée de *pscC* sont incubés avec une membrane sur laquelle a été transférée la protéine ExsB avec des étiquettes protéiques hexa-histidine et MBP purifiée à partir de *E. coli*. Les protéines sont alors révélées avec l'anticorps anti PscC (Figure 65).



**Figure 65 : Overlay de lysats bactériens sur des membranes portant la protéine ExsB purifiée.** Les membranes portant la protéine ExsB purifiée ont été incubées avec les lysats bactériens de la souche de *P. aeruginosa* sauvage (CHA) ou délétée de *pscC* ( $\Delta pscC$ ) préparés dans du détergent. Les contrôles négatifs et positifs (- et +) sont les membranes portant ExsB directement révélées avec les anticorps dirigés contre PscC et ExsB.

Les résultats montrent que l'anticorps dirigé contre PscC reconnaît des protéines dans l'extrait de ExsB (Figure 65). Cela peut s'expliquer par le fait que quelques protéines contaminantes, bien que très minoritaires, sont présentes dans la fraction purifiée de ExsB et ont été reconnues par l'anticorps. Cependant, aucune interaction entre ExsB et PscC n'est détectée puisqu'aucun signal à la hauteur de la protéine ExsB n'est révélé lorsque la membrane est incubée avec les lysats bactériens. Il est possible que la protéine PscC présente dans les extraits bactériens n'ait pas été correctement solubilisée, malgré la présence de détergent. C'est pourquoi cette expérience d'overlay a aussi été réalisée en sens inverse, c'est-à-dire avec une membrane sur laquelle ont été transférés des lysats de *P. aeruginosa* sauvage ou délétée de *pscC* qui a été incubée avec l'extrait de protéine ExsB. La révélation des protéines est effectuée par Western blot avec l'anticorps anti-ExsB (Figure 66).



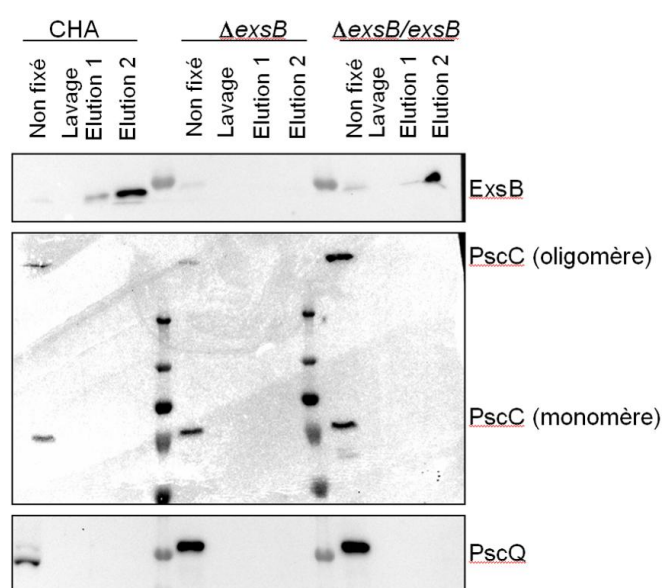
**Figure 66 : Overlay de la protéine ExsB purifiée sur des membranes portant des lysats bactériens de la souche de *P. aeruginosa* sauvage (CHA) ou délétée de *pscC* ( $\Delta pscC$ ).**

Encore une fois, aucune interaction n'est détectée entre les deux protéines. Une perspective envisagée serait de réaliser un overlay avec les deux protéines purifiées, car la protéine PscC est en cours de purification à l'IBS.

Le « **pull down** » est une méthode présentant l'avantage de s'intéresser aux interactions qui se produisent naturellement dans la bactérie, contrairement à la technique de l'overlay décrite précédemment qui repose sur l'interaction des protéines *in vitro*. La protéine ExsB, fusionnée à une étiquette Strep, appelée ExsB Strep est exprimée par un plasmide dans *P. aeruginosa*. Les membranes solubilisées à partir de l'extrait bactérien correspondant sont appliquées à une colonne d'affinité.

D'après une analyse par Western blot, la protéine ExsB Strep est bien présente dans les fractions d'élution (résultats non montrés). Par contre, l'interaction entre ExsB et PscC n'a pas été détectée puisque la protéine PscC n'a pas été révélée dans les fractions d'élution. L'utilisation d'un plasmide pour la biosynthèse de ExsB Strep conduit à une très forte expression de cette protéine de fusion, et il est possible que les interactions détectées dans ces conditions soient différentes de celles qui ont lieu dans des conditions physiologiques. Par exemple, une petite proportion de ExsB Strep interagit peut être avec ses partenaires naturels, mais toute la protéine exprimée en excès n'a peut être plus d'interactant ou bien des interactants non spécifiques.

Finalement, des essais d'**immunoprécipitation** ont été réalisés pour capturer les protéines interagissant avec ExsB directement dans la bactérie. Pour cela, les anticorps purifiés dirigés contre ExsB ont été fixés par pontage covalent à des billes magnétiques, puis les extraits bactériens ont été incubés directement avec ces billes. Après lavage, les protéines liées aux anticorps sont éluées par une diminution du pH puis analysées par Western blot. Les protéines qui devraient être détectées sont la protéine ExsB, liée avec une forte affinité à ses anticorps spécifiques, mais aussi les protéines qui interagissent avec ExsB.



**Figure 67 : Immunoprécipitation de la protéine ExsB à partir d'extraits bactériens des souches de *P. aeruginosa* sauvage (CHA), délétée de *exsB* ( $\Delta exsB$ ) et complémentée ( $\Delta exsB/exsB$ ). La fraction non fixée aux anticorps dirigés contre ExsB, la fraction de lavage ainsi que les fractions d'élution ont été analysées par immunoblot. Les fractions d'élution correspondent aux protéines qui étaient liées fortement aux anticorps et qui sont décrochées lors de l'élution 1 à température ambiante ou bien lors de l'élution 2 à 70°C.**

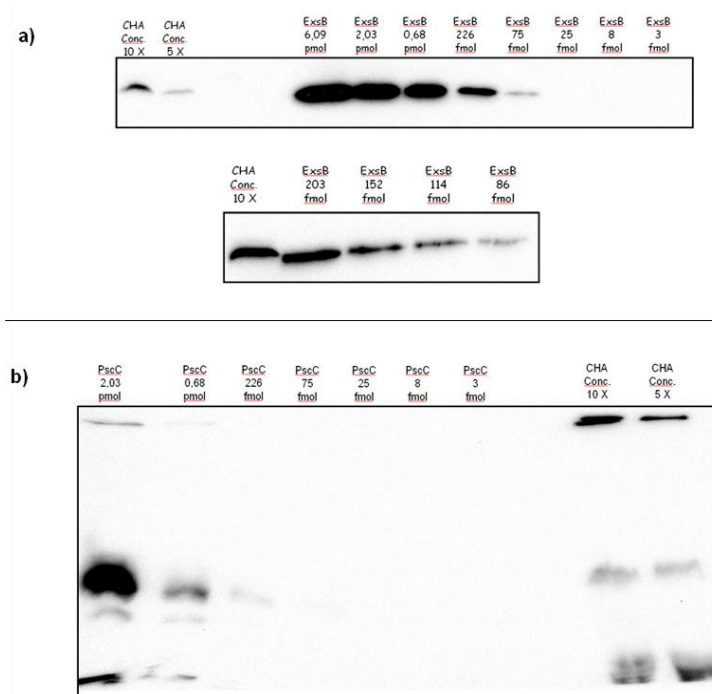
La protéine ExsB est bien retrouvée dans la fraction d'élution (Figure 67). Par contre, ni le partenaire potentiel de ExsB, la sécrétine PscC, ni la protéine PscQ, composant du SST3, ne sont retrouvées dans la fraction d'élution. Pour tester la présence d'autres protéines dans la fraction d'élution, une coloration à l'argent a été réalisée, mais aucun partenaire protéique n'a pu être mis en évidence. En effet, aucune bande différente n'a été observée entre les fractions d'élution des différentes bactéries (résultats non montrés). L'immunoprécipitation par les anticorps dirigés contre ExsB n'a donc pas permis d'identifier de partenaire pour ExsB. Il est possible que cette technique nécessite de nombreuses mises au point supplémentaires, en particulier pour le type et la concentration de détergent utilisé. En effet, l'utilisation d'un détergent est indispensable pour solubiliser les protéines membranaires. Cependant, la présence d'un détergent trop fort ou en trop forte concentration peut conduire à la destruction des interactions entre protéines. De plus, d'après la bibliographie, l'interaction entre la pilotine et la sécrétine du SST3 chez *Shigella flexneri* et chez *Salmonella typhimurium* n'a pu être visualisée par immunoprécipitation que lorsqu'un crosslinker était utilisé.

La manipulation a donc été refaite en utilisant un crosslinker. Malheureusement, les résultats obtenus étaient tout à fait similaires (résultats non montrés). Toutes les fractions d'élution ont été analysées par spectrométrie de masse par Yohann Coute de la plateforme Edyp du laboratoire Biologie à Grande Echelle du CEA de Grenoble. Plusieurs protéines contaminantes, telles que des chaperonnes cytoplasmiques, sont détectées spécifiquement dans les fractions d'élution de la souche sauvage et de la souche complémentée. Sont également détectées certaines protéines du SST3, notamment PopB. Malheureusement, aucun composant du corps basal de cette machinerie n'est détecté. Ces résultats n'excluent pas la possibilité d'une interaction entre ExsB et la sécrétine PscC. En effet, l'absence de composants du corps basal du SST3 pourrait être due à une solubilisation insuffisante des protéines membranaires, bien que des porines soient détectées. Une autre possibilité pourrait être que l'interaction entre ExsB et la sécrétine PscC pourrait être trop transitoire pour être visualisée. Cette argument est appuyé par l'absence de partenaires protéiques de la voie Lol, pourtant impliqués dans la prise en charge des lipoprotéines telles que ExsB pour leur association à la membrane externe. L'immunoprécipitation a été réalisée une nouvelle fois à une plus grande échelle afin d'augmenter le ratio signal spécifique / bruit de fond, sur les lysats bactériens totaux ainsi que sur les membranes solubilisées. Les fractions d'élution sont actuellement en cours d'analyse par spectrométrie de masse.

En conclusion, aucune des techniques utilisées n'a permis d'identifier des interactions entre ExsB et la protéine PscC. Il est possible que ces deux protéines n'interagissent pas directement mais via un partenaire. Une autre hypothèse est que l'interaction entre ces protéines est transitoire et ne peut être détectée. Par exemple, ExsB pourrait interagir avec la sécrétine au niveau du périplasme, pour la conduire jusqu'à la membrane externe et participer à son assemblage. Une fois les oligomères de PscC correctement assemblés, ExsB n'interagit peut être plus avec cette protéine. De plus, la détection d'une interaction entre ExsB et PscC est d'autant plus complexe que la quantité de protéine ExsB produite est faible. Enfin, il est possible que seule une partie des populations de ExsB et PscC interagissent.

#### 6) Evaluation des quantités relatives de ExsB et de PscC

L'évaluation des quantités relatives de ExsB et de PscC exprimées par *P. aeruginosa* permet de donner une idée des ratios molaires dans lesquelles ces deux protéines pourraient interagir. La quantité de ExsB présente dans des extraits bactériens de la souche sauvage de *P. aeruginosa* a été comparée par Western blot avec des quantités connues de la protéine ExsB pure. De même, la manipulation a été effectuée pour quantifier la sécrétine PscC.



**Figure 68 : Quantification des protéines ExsB et PscC exprimées dans *P. aeruginosa* sauvage.**  
**a) Analyse par Western blot de la quantité de ExsB produite par la souche sauvage CHA de *P. aeruginosa* par comparaison avec des quantités connues de la protéine purifiée.**  
**b) Analyse par Western blot de la quantité de PscC produite par la souche sauvage CHA de *P. aeruginosa* par comparaison avec des quantités connues de la protéine purifiée. L'échantillon de sécrétine PscC purifiée a été donné par Tommaso Tosi et Viviana Job de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble.**

Ainsi, environ 175 fmol de protéine ExsB sont produites dans 100µL de bactéries à DO<sub>600nm</sub> 1, ce qui correspond à 1750 protéines ExsB produites par chaque bactérie (Figure 68).

L'évaluation de la quantité de protéine PscC a été plus délicate car la protéine pure est principalement visualisée sous forme de monomère alors qu'au contraire la sécrétine des extraits bactériens est principalement présente sous forme d'oligomère.

La quantité de sécrétine peut néanmoins être grossièrement estimée à 1,3 pmol dans 100µL de bactéries à DO<sub>600nm</sub> 1. Il y aurait donc environ 13 600 protéines PscC par bactérie, même si ce chiffre reste incertain (Figure 68). Les bactéries exprimeraient plus de sécrétine PscC que de protéine ExsB (ratio 7,7 / 1).

#### **H. Comportement de ExsB en l'absence de la sécrétine PscC**

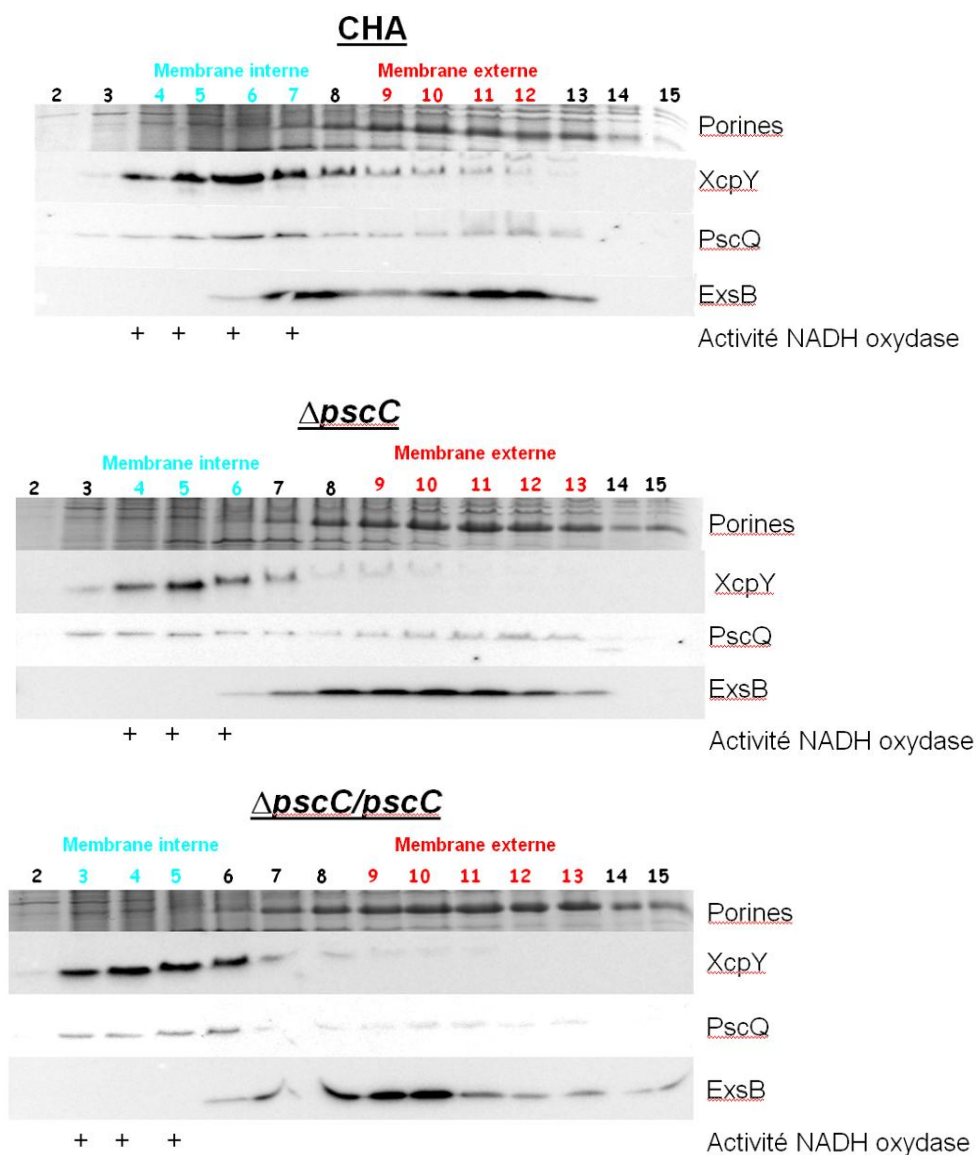
Les études précédentes ont permis de montrer un rôle de ExsB sur l'assemblage de la protéine PscC au niveau de la membrane externe de *P. aeruginosa*. Nous nous sommes aussi interrogés sur l'expression et la localisation de ExsB en l'absence de PscC.

Il est possible que la protéine ExsB soit rapidement dégradée lorsque la protéine PscC n'est pas exprimée, ou bien qu'elle ne se dirige pas dans la membrane externe tant qu'elle n'interagit pas (de façon directe ou indirecte) avec PscC.

L'expression de ExsB dans la souche de *P. aeruginosa* délétée de *pscC* a été vérifiée par Western blot. Puis, la localisation de ExsB dans les membranes interne ou externe de cette souche bactérienne a été étudiée en comparaison avec la souche sauvage (Figure 69).

Les résultats obtenus après séparation des membranes par gradient de saccharose montrent que la protéine ExsB est toujours correctement exprimée et localisée dans la membrane externe, y compris en l'absence de PscC (Figure 69). La protéine ExsB ne nécessite donc pas la sécrétine PscC pour être correctement exprimée et localisée alors que la sécrétine PscC a besoin de ExsB pour son assemblage.





**Figure 69 : Etude de la localisation de ExsB en l'absence de la sécrétine PscC.** Les membranes interne et externe des souches de *P. aeruginosa* sauvage (CHA), dépourvue de *pscC* ( $\Delta$ pscC) et complétée ( $\Delta$ pscC/pscC) ont été séparées par gradient de saccharose. Les fractions obtenues ont été analysées par coloration au bleu de Coomassie pour visualiser les porines de la membrane externe, mais aussi par Western blot dirigés contre la protéine de la membrane interne XcpY, la protéine PscQ du SST3 et la protéine ExsB. Le dosage de l'activité NADH oxydase a permis d'identifier les fractions contenant la membrane interne.

## I. Conclusions et perspectives

En conclusion, après avoir résolu la structure de la protéine ExsB, nous avons montré qu'elle est bien exprimée chez *P. aeruginosa* et qu'elle est localisée dans la membrane externe de la bactérie, tout comme la sécrétine PscC du SST3.

Deux hypothèses avaient été émises quant au rôle de ExsB dans le SST3. La première était que ExsB pourrait être impliquée dans la régulation du SST3, étant donné que son gène est localisé dans l'opéron de régulation de ce système. La seconde hypothèse était que ExsB pourrait être une pilotine, comme son homologue chez *Yersinia spp.*, c'est-à-dire participer à l'assemblage du composant de la membrane externe du SST3.

Afin de comprendre le rôle de ExsB, une souche délétée du gène codant pour cette protéine a été construite et son phénotype a été analysé.

La délétion de *exsB* est une mutation polaire, qui conduit vraisemblablement à une amélioration de la stabilité de l'ARN messager de tout l'opéron de régulation. Des expériences permettant de mesurer le niveau d'activation transcriptionnelle du système ont prouvé que la protéine ExsB n'a pas de rôle dans l'activation de l'expression de toxines du SST3.

Cette protéine pourrait par contre avoir un rôle dans l'activité du SST3 et donc dans la virulence du bacille pyocyanique. La survie de souris infectées par inhalation de *P. aeruginosa* est améliorée en l'absence de ExsB, ce qui confirme l'implication de cette protéine dans la virulence lors d'infections aiguës. Le SST3 étant un important facteur de virulence activé dans ce type d'infection, ces résultats indiquent donc que la protéine ExsB est probablement impliquée dans l'activité de ce système.

Les tests de cytotoxicité réalisés pour vérifier cette hypothèse sur différents types de cellules montrent une diminution de la cytotoxicité dépendant du SST3 en l'absence de ExsB. Cette diminution est due à une diminution de la quantité de toxines injectées dans le cytoplasme des cellules eucaryotes cibles, elle-même provoquée par une diminution de la sécrétion des protéines du SST3. Par ailleurs, il a été vérifié que l'injection dans les cellules hôtes est polarisée et que les protéines du système sont correctement exprimées en l'absence de ExsB.

Tous ces résultats ont bien démontré l'importance de la protéine ExsB dans l'activité du SST3 et suggèrent que ExsB participerait à l'assemblage du SST3 et pourrait être une pilotine, d'autant plus que le phénotype observé en l'absence de ExsB est tout à fait similaire à celui de souches de *Yersinia spp* délétées de la pilotine du SST3. En effet, les bactéries *Yersinia spp.* délétées de leur pilotine présentent une diminution de la sécrétion de la plupart

des protéines du SST3 et conduisent à une réduction de l'apoptose de macrophages lors d'infections réalisées *in vitro* et *in vivo* sur des souris (Bi et al. 2009 ; Allaoui et al. 1995).

Afin de vérifier que ExsB participe à l'**assemblage du SST3** de *P. aeruginosa*, les aiguilles de ce système assemblées par les bactéries ont été visualisées par microscopie électronique. Cela a effectivement permis de mettre en évidence une diminution du nombre d'aiguilles en l'absence de ExsB. Un mauvais assemblage de la sécrétine PscC pourrait être à l'origine de la diminution du nombre d'aiguilles du SST3 constaté en l'absence de *exsB*, d'autant plus que la sécrétine est l'un des premiers composants du système à être mis en place (Diepold et al. 2010). En effet, les aiguilles ne peuvent être assemblées que lorsque des composants de la base du SST3 sont placés au niveau des deux membranes bactériennes, et en particulier lorsque la sécrétine PscC est insérée sous forme d'oligomère dans la membrane externe.

La protéine ExsB, elle aussi associée à la membrane externe de la bactérie, pourrait donc être une pilotine pour la sécrétine PscC, c'est-à-dire aider à sa stabilisation, oligomérisation et/ou localisation. La délétion du gène codant pour ExsB conduit à une forte diminution de la quantité d'**oligomères** de sécrétine sans augmentation de la quantité de monomères. Par contre, elle n'augmente pas la susceptibilité à la dégradation de la sécrétine sous forme oligomérique.

Le rôle exact de ExsB sur la **localisation** de PscC ne peut être affirmé, car les deux méthodologies utilisées, pourtant décrites comme les plus fiables (Hobb et al. 2009) ont des limites. La première méthodologie, la séparation des membranes par solubilisation différentielle à l'aide de détergents, conduit à des difficultés de solubilisation des protéines de la membrane interne possédant de nombreux segments transmembranaires. En conséquence, ces protéines fortement insérées dans la membrane interne sont extraites dans la fraction de membrane externe au lieu de la fraction de membrane interne. La seconde méthodologie, la séparation des membranes en fonction de leur densité par gradient de saccharose, est fiable pour la localisation des protéines insérées dans les membranes mais pas pour les protéines associées aux membranes *via* des interactions protéiques. Les deux méthodologies indiquent une mauvaise localisation soit des monomères soit des oligomères de sécrétine dans la membrane interne au lieu de la membrane externe dans le mutant  $\Delta exsB$ .

Néanmoins, ces résultats confirment l'effet de la protéine ExsB sur l'assemblage de la sécrétine. Le rôle de la protéine ExsB sur la sécrétine PscC est particulièrement proche de

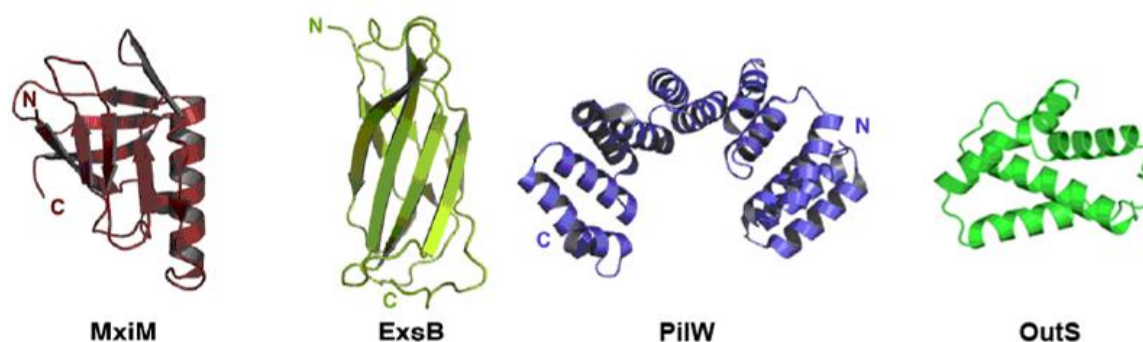
celui de la pilotine YscW de *Yersinia spp.* sur sa sécrétine YscC. En effet, une souche délétée de *yscW* présente des défauts dans l'assemblage de la sécrétine très similaires à ceux observés chez *P. aeruginosa* délétée de *exsB*, comme présenté dans le tableau ci-dessous (Tableau 13). Par contre, ces défauts sont différents lorsque les pilotines des SST3 de *Shigella flexneri* et de *Salmonella typhimurium* ne sont pas exprimées. La protéine ExsB pourrait donc appartenir à la même famille de pilotine que YscW de *Yersinia spp.* Cela est d'autant plus probable que ces deux protéines présentent des similarités de séquences.

Espèce bactérienne	Diminution de la quantité d'oligomères de sécrétine	Mauvaise localisation de la sécrétine dans la membrane interne	Références
<i>Salmonella typhimurium</i>	non	oui	Daeﬂer S. et Russel M., 1998
<i>Shigella flexneri</i>	oui	non	Schuch R. et Maurelli AT., 2001
<i>Yersinia spp</i>	oui	oui*	Burghout P. et al., 2004
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	oui	oui*	Ce travail

**Tableau 13 : Rôle des pilotines de SST3 bactériens sur leur sécrétine. \*en gradient sucrose**

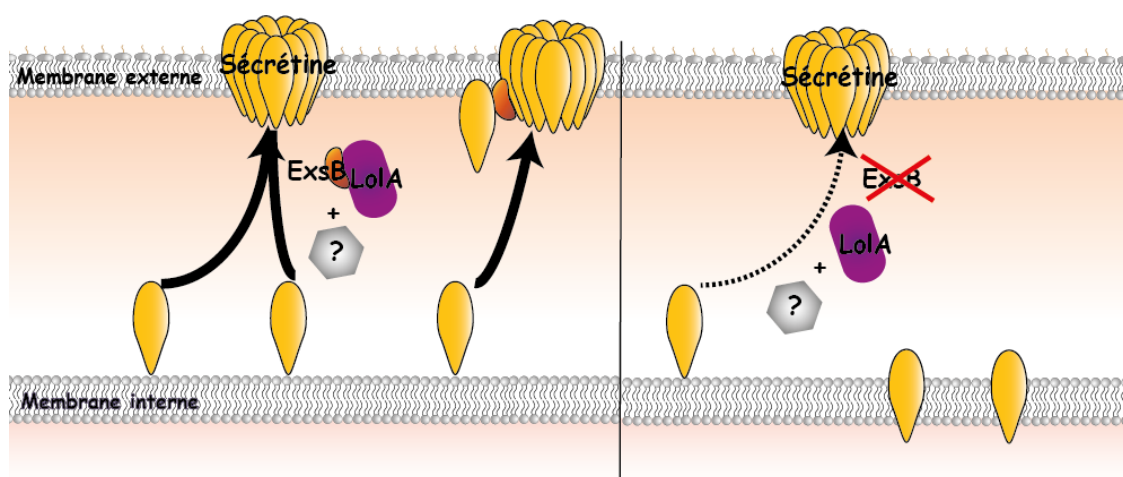
Finalement, la protéine ExsB est bien une **pilotine pour la sécrétine PscC**. Bien que les pilotines aient des structures très différentes, comme illustré par la figure suivante (Figure 70), elles aident toutes les sécrétines, protéines de la membrane externe, à être correctement assemblées pour former les différents appareils de sécrétion.

Pourtant, les sécrétines sont des protéines très conservées, qui forment des oligomères très stables de 12 à 14 sous unités. Les différences structurales des pilotines suggèrent donc qu'elles interagissent avec un domaine peu conservé des sécrétines.



**Figure 70 : Structures de différentes pilotines : MxiM, du SST3 de *Shigella flexneri* ; ExsB, du SST3 de *Pseudomonas aeruginosa* ; PilW du pili de type IV de *Neisseria meningitidis* et OutS du SST2 de *Dickeya dadanti*. (Izoré et al, 2011)**

Finalement, un modèle d'action de ExsB pourrait être que cette protéine, probablement avec l'aide d'autre(s) protéine(s), participe à l'oligomérisation de la sécrétine dans la membrane externe. Par contre, en l'absence de ExsB, seulement une petite quantité de sécrétine est correctement assemblée dans la membrane externe tandis que des monomères ou oligomères de sécrétines restent dans la membrane interne. La sécrétine, une fois correctement assemblée, serait protégée de la dégradation (Figure 71). Le fait qu'une partie de la sécrétine soit correctement assemblée même en l'absence de ExsB laisse penser qu'un mécanisme autre que le pilotage par ExsB est impliqué dans l'assemblage de PscC.



**Figure 71 : Schéma du rôle probable de ExsB dans l'assemblage de la sécrétine.**

Plusieurs études suggèrent l'implication de la voie Lol et non pas de la voie Bam dans l'assemblage des sécrétines de SST3. Le système Lol prend en charge la localisation des lipoprotéines tandis que le système Bam permet l'insertion des autres protéines dans les membranes. Chez *Shigella flexneri*, la pilotine, interagissant avec la sécrétine, serait prise en charge par la protéine LolA pour être emmenée jusqu'à la membrane externe. L'assemblage de la sécrétine dans la membrane externe reposerait donc sur le complexe LolA-pilotine-sécrétine (Derrick 2008). Ce modèle est d'autant plus probable chez *P. aeruginosa* que la quantité de sécrétine PscC est quasiment nulle en l'absence de la voie Lol (Hoang et al. 2011). Il pourrait donc être intéressant de vérifier la localisation de la pilotine ExsB dans des souches de *P. aeruginosa* délétées de la voie Lol ou de la voie Bam. Dans ce but, les plasmides permettant la construction de ces souches bactériennes ont été donnés par S. Lory et V. Lee.

La présence de quelques oligomères de sécrétine PscC dans la membrane externe en l'absence de ExsB peut s'expliquer de plusieurs manières. Tout d'abord, il serait possible que la sécrétine soit capable de s'acheminer puis de s'insérer toute seule dans la membrane mais

avec une très faible efficacité étant donné qu'elle n'a pas sa protéine pilote ExsB pour la guider et l'assister. Cependant, des études de la capacité de PscC à former des pores dans des liposomes semblent montrer que PscC serait incapable de s'insérer seule dans la membrane (Hoang et al. 2011). Une autre hypothèse serait qu'une autre protéine pourrait participer dans une moindre mesure à l'assemblage de la sécrétine PscC. Il pourrait s'agir de la lipoprotéine de la membrane interne, PscJ. En effet, il a déjà été montré chez *Shigella flexneri* que l'homologue à PscJ est impliqué dans la stabilisation de la sécrétine dans la membrane externe (Schuch et al. 2001). Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait étudier le phénotype d'une souche de *P. aeruginosa* délétée de *pscJ* et plus particulièrement la capacité d'assemblage de la sécrétine PscC. De plus, un double mutant *exsB-pscJ* pourrait être construit. Si une partie de la sécrétine PscC était toujours exprimée et localisée dans la membrane externe de ce double mutant, cela signifierait qu'il existe une autre protéine impliquée dans l'assemblage de PscC.

Afin de déterminer si l'effet de ExsB sur la sécrétine PscC est direct ou indirect, l'interaction et la co-localisation de ces deux protéines ont été recherchés. Malheureusement, les diverses méthodologies mises en œuvre, c'est-à-dire l'immunofluorescence, l'overlay, la co-purification via une étiquette Strep et l'immunoprécipitation, n'ont pas permis de mettre en évidence le lien entre ces protéines, probablement en raison de limitations techniques ou de quantités trop faibles de protéines. D'après la littérature, toutes ces techniques ont été classiquement utilisées pour détecter les interactions pilotine-sécrétine. Par exemple, l'overlay a permis de montrer l'interaction entre la pilotine et la sécrétine du SST2 de *D. dadanti* (Shevchik et al. 1998). De même, la pilotine de *K. oxytoca* a co-purifié avec sa sécrétine lors de l'expression des protéines du SST2 dans *E. coli* (Nouwen et al. 1999). Cependant, la recherche des interactions entre la pilotine et la sécrétine dans le cas du SST3 apparaît plus complexe. Ainsi, chez *Shigella flexneri* comme chez *Salmonella enterica*, l'utilisation d'un cross linker lors de l'immunoprécipitation est indispensable pour détecter le complexe pilotine-sécrétine (Daeﬂer et al. 1998 ; Lario et al. 2005 ; Okon et al. 2008 ; Derrick 2008). Chez *Yersinia enterocolitica*, l'interaction entre la pilotine YscW et la sécrétine YscC n'a pas pu être montrée. Par contre, l'effet de YscW sur YscC a été observé dans des souches n'exprimant aucune autre protéine du SST3, ce qui suggère une interaction entre ces deux protéines (Burghout et al. 2004). De plus, la protéine YscW ne co-purifie pas avec la sécrétine YscC, contrairement à la pilotine de *K. oxytoca* (Burghout et al. 2004). Cette difficulté à détecter les interactions entre les pilotines et les sécrétines des SST3 est peut-être due au fait

que ces interactions sont transitoires. En effet, il est possible que les protéines interagissent seulement dans le périplasme, pendant que la pilotine conduit la sécrétine jusqu'à la membrane externe.

D'autres méthodologies pourraient être mises en œuvre pour tenter de détecter l'interaction entre ces deux protéines *in vitro*, comme par exemple un overlay des protéines ExsB et PscC purifiées puisqu'une technique de purification de la sécrétine vient d'être mise au point à l'IBS. Une autre possibilité serait d'utiliser un système bactérien double hybride basé sur une librairie de fragments d'ADN génomique de *P. aeruginosa*. Cette technique, décrite récemment par L. Houot et al (2012), repose sur la reconstitution de l'adenylate cyclase, qui conduit à la formation d'AMP cyclique, lors de l'interaction entre deux partenaires. Elle présente l'avantage de pouvoir détecter des interactions inconnues, mais n'a jamais été utilisée à notre connaissance pour des protéines de la membrane externe (Houot et al. 2012).

Une approche envisagée *in vivo* serait de construire une protéine ExsB périplasmique (dépourvue du domaine Nterminal permettant son ancrage à la membrane externe, ou bien possédant une mutation de la cystéine de la lipobox permettant sa lipidation) afin de faciliter l'interaction entre ExsB et PscC dans le cas où cette interaction se ferait de façon transitoire dans le périplasme. De plus, cette protéine périplasmique permettrait d'évaluer si les effets de ExsB sur la sécrétine (quantité des oligomères et localisation des monomères ou oligomères) peuvent être dissociés. Par exemple, il a été démontré chez *D. dadanti* et *K. oxytoca* que l'association de la pilotine à la membrane externe était indispensable pour une bonne localisation de la sécrétine mais pas pour augmenter la quantité d'oligomères de sécrétine, tandis que chez *Y. enterocolitica* cette association est importante pour les deux activités de la pilotine (Shevchik et al. 1998 ; Hardie et al. 1996 ; Burghout et al. 2004).

Le rôle du domaine C terminal de la sécrétine PscC pourrait également être étudié afin de comprendre s'il est impliqué dans l'interaction et/ou la dépendance de la pilotine ExsB. Pour cela, les effets de ExsB sur la sécrétine ou l'assemblage du SST3 pourraient être suivis dans une souche exprimant la PscC tronquée de ce domaine, PscC $_{\Delta Cter}$ . Chez les couples pilotine-sécrétines des différentes bactéries, le domaine C terminal de la sécrétine interagit souvent avec la pilotine, comme chez les SST2 de *D. dadanti* et *K. oxytoca* ou chez le SST3 de *Shigella flexneri* (Gu et al. 2012 ; Daefler et al. 1997 ; Lario et al. 2005 ; Okon et

al. 2008). Ce domaine n'est par contre pas impliqué dans l'interaction pilotine-sécrétine chez le SST3 de *Y. enterocolitica* (Burghout et al. 2004). Enfin, chez le SST2 de *K. oxytoca* et le SST3 de *Y. enterocolitica*, le domaine C terminal de la sécrétine rend cette protéine dépendante de sa pilotine pour sa localisation dans la membrane externe (Daefler et al. 1997 ; Burghout et al. 2004).

Une autre perspective serait de réaliser des mutations au niveau des acides aminés identifiés sur la structure comme potentiellement importants pour l'activité de ExsB. L'analyse phénotypique des mutants grâce aux outils développés au cours de cette étude permettrait de confirmer l'importance de ces acides aminés.

Il pourrait également être intéressant d'étudier l'action de ExsB sur d'autres sécrétines ou bien d'étudier le rôle d'autres pilotines sur la sécrétine PscC. Il serait judicieux pour cela d'utiliser des couples pilotine-sécrétine de la même famille que ExsB-PscC, tels que YscW-YscC.

Etant donné la très faible homologie structurale et de séquence de ExsB avec les autres pilotines, il est probable que les couples pilotine-sécrétine des autres familles n'aient aucun effet sur l'assemblage du SST3 de *P. aeruginosa*. Ces expériences permettraient de tester si les pilotines d'une même famille sont interchangeables, et donc de se rendre compte si elles partagent des caractéristiques clés communes.

En conclusion, ce travail a permis d'identifier et de caractériser le rôle de pilotine de la protéine ExsB du SST3 de la bactérie pathogène opportuniste *P. aeruginosa*, et de montrer que cette protéine est une nouvelle pièce participant à l'assemblage du SST3. La protéine ExsB est en effet un acteur important de l'assemblage de la sécrétine, l'anneau de la membrane externe du système, même si d'autres mécanismes entrent en jeu et restent à découvrir. Tous ces résultats permettent une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la mise en place de ce système, particulièrement lié à la virulence de la bactérie.





# Conclusion générale



De nos jours, la nécessité de trouver des alternatives aux traitements antibiotiques pour lutter contre les micro-organismes pathogènes rend l'étude de leurs facteurs de virulence indispensable. Une meilleure compréhension des mécanismes de virulence est en effet la première étape dans l'identification de cibles thérapeutiques spécifiques. L'un de ces facteurs de virulence, le Système de Sécrétion de Type III (SST3), est très conservé parmi de dangereux pathogènes bactériens. Chez le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*, cause d'infections nosocomiales et de mortalité des personnes atteintes de mucoviscidose, le SST3 est associé à de mauvais pronostics cliniques. Le blocage du SST3 pourrait donc être une perspective thérapeutique pour combattre *P. aeruginosa*. Pour cela, le fonctionnement du SST3 doit être bien compris. Dans ce cadre, l'objectif de la thèse était d'étudier deux protéines du SST3 de *P. aeruginosa* : l'ATPase PscN et la protéine ExsB.

L'ATPase PscN du SST3 de *P. aeruginosa* a été étudiée pour la première fois. Les premières expériences ont permis de vérifier que son activité est indispensable au fonctionnement du système puisqu'en son absence, *P. aeruginosa* n'est pas cytotoxique envers les cellules eucaryotes.

En se basant sur l'homologie avec d'autres ATPases de SST3 bactériens, des mutations ont été réalisées au niveau d'un acide aminé du site catalytique de PscN ou de l'acide aminé imbriqué dans le site actif de la sous-unité adjacente. Les souches exprimant l'ATPase PscN ainsi mutée ne sont pas cytotoxiques, et ces effets sont dominants-négatifs. Ces résultats confirment que PscN, comme ses homologues, s'assemble probablement en oligomère et que l'insertion de sous-unités d'ATPase inactives conduit à un complexe d'ATPase incapable d'accomplir ses fonctions dans le SST3. Ils permettent également de valider l'utilisation des souches exprimant PscN mutée en tant que contrôle négatif de l'activité ATPase.

Dans le but d'étudier *in vitro* l'activité de PscN sur différents substrats du SST3, une méthode a été développée pour l'obtention de la protéine PscN partiellement purifiée et active. Le développement de cette méthode s'est révélé très délicat du fait de la faible quantité d'ATPase soluble exprimée par les bactéries. Dans les fractions partiellement purifiées, l'ATPase est présente sous forme d'un grand complexe de plus de 1000 kDa, qui pourrait correspondre à des particules de 17,5 nm de diamètre et 7 nm de hauteur visualisées en microscopie électronique. D'autres protéines du SST3 sont également présentes dans ces échantillons et pourraient constituer des partenaires de PscN. L'obtention des fractions d'ATPase PscN partiellement purifiée ouvre de nombreuses perspectives pour l'étude *in vitro* des rôles de PscN, notamment sur la dissociation de complexe chaperonnes-substrats du SST3 et le

déplieement de ces substrats. Pour aller plus loin, un criblage des molécules inhibitrices de l'ATPase PscN partiellement purifiée, et donc inhibitrices du SST3, pourrait être envisagé.

Ce travail de thèse a également permis de caractériser la protéine ExsB, jusqu'alors jamais étudiée et dont l'expression chez *P. aeruginosa* était incertaine. Localisée dans la membrane externe de la bactérie, elle est impliquée *in vivo* dans la virulence de *P. aeruginosa*, comme l'a révélé un modèle d'infection pulmonaire aigüe de souris. L'analyse phénotypique d'une souche dépourvue de *exsB* et de sa complémentation dans le chromosome a permis d'étudier le rôle de cette protéine. Bien que *exsB* soit localisé dans l'opéron de régulation du SST3, aucun rôle de ExsB dans la régulation du système n'a été identifié. Par contre, les tests d'activation du SST3 et d'expression de l'activateur transcriptionnel ont montré que la délétion de *exsB* est une mutation polaire, qui conduit vraisemblablement à une stabilisation de l'ARN messenger de l'opéron de régulation, et par suite à une suractivation du système. C'est pourquoi un plasmide permettant une surexpression constitutive du SST3 a été utilisé pour mieux comparer les phénotypes des différentes souches de *P. aeruginosa*. L'étude de l'activité du SST3 a dévoilé une diminution de la cytotoxicité envers différents types de cellules eucaryotes en l'absence de *exsB*. Cette diminution de cytotoxicité est provoquée par une baisse de la quantité d'effecteurs injectés dans le cytoplasme des cellules cibles. Cette baisse n'est pas due à un défaut de polarisation de l'injection, puisqu'il n'y a pas de fuite des effecteurs dans le milieu extracellulaire, mais à une diminution de la sécrétion des substrats du SST3 observée *in vitro*.

Le rôle moléculaire de ExsB a ensuite été analysé. Des observations en microscopie électronique ont révélé une diminution de la quantité d'aiguilles du SST3 assemblées en l'absence de ExsB. Ce défaut d'assemblage du SST3 explique les résultats des tests d'expression et de sécrétion des substrats, puisqu'ils sont bien produits par les souches dépourvues de *exsB* mais ils sont peu sécrétés. Pour aller plus loin, des expériences de localisation membranaire ont montré que ExsB accomplit une fonction de pilotine pour la sécrétine PscC, le composant de la membrane externe du SST3. En effet, ExsB participe à l'assemblage de cette protéine dans la membrane externe de la bactérie. Cette étude a ainsi montré que la protéine ExsB est un acteur de l'assemblage de la sécrétine, même si d'autres mécanismes sont encore méconnus puisque même en l'absence de ExsB une petite proportion de sécrétine est toujours correctement assemblée. D'après les résultats obtenus, ExsB appartiendrait à la même famille de pilotine que son homologue chez *Yersinia spp.*, famille

distincte de celle des pilosines de *Salmonella spp.* et *Shigella flexneri*. Il serait intéressant de tester l'interchangeabilité de ces pilosines. Malgré l'effet de ExsB sur l'assemblage de la sécrétine PscC, aucune interaction n'a pu être démontrée entre ces deux protéines par les diverses stratégies mises en œuvre. Une perspective serait de mettre en place d'autres méthodologies afin de comprendre si le rôle de ExsB sur la sécrétine est direct ou fait intervenir des intermédiaires. Il serait également intéressant de caractériser plus précisément la fonction du domaine N-terminal de ExsB, et donc de son association à la membrane externe, dans l'assemblage de la sécrétine. De même, la fonction du domaine C-terminal de la sécrétine PscC dans l'activité de ExsB pourrait être étudié. Enfin, une autre perspective consisterait à identifier les autres partenaires impliqués dans l'assemblage de la sécrétine, en particulier en étudiant le rôle d'une autre lipoprotéine, PscJ, dans l'assemblage de la sécrétine.

En conclusion, cette étude de deux protéines du SST3 de *P. aeruginosa*, PscN et la protéine ExsB, a bien permis d'améliorer la compréhension du fonctionnement de ce système, et en particulier de son assemblage. Une bonne connaissance du fonctionnement du SST3 est très utile pour identifier des applications thérapeutiques, notamment pour cibler et bloquer spécifiquement ce système. L'inhibition de l'activité de l'ATPase, enzymatique et/ou envers les substrats du SST3 par des petites molécules, permettrait d'empêcher les bactéries de présenter un SST3 fonctionnel. De même, le blocage du SST3 à un stade précoce de son assemblage, lors de la mise en place du composant de la membrane externe de ce système, la sécrétine, pourrait être intéressant. L'intérêt thérapeutique est d'autant plus important que certaines molécules inhibitrices pourraient avoir un large spectre d'action sur plusieurs SST3 du fait des homologies entre ces appareils de sécrétion, et en particulier sur de dangereux pathogènes tels que *Yersinia pestis*, l'agent responsable de la peste, ou bien *Salmonella spp.* et *Shigella spp.*.



# **Annexes**





**Annexe 1 : Tableau des protéines détectées par spectrométrie de masse dans les fractions d'ATPase PscN partiellement purifiées**

description	masse	Abondance protéine (%)
ATP synthase in type III secretion system	48173	21,8
Chaperone protein dnaK	68457	3,6
Lon protease	88784	2,0
PvdJ(2)	553142	0,1
NAD-specific glutamate dehydrogenase (gdhB)	183052	0,5
Methylcrotonyl-CoA carboxylase, alpha-subunit (Biotin-containing)	71574	1,8
Biotin carboxylase (accC)	49193	3,2
ATP synthase subunit beta (atpD)	49517	3,2
Acyl-CoA carboxyltransferase beta chain (gnyB)	57877	2,0
DNA-directed RNA polymerase subunit beta (rpoB)	151180	0,4
60 kDa chaperonin (groL)	57082	2,8
PvdI(2) (pvdI)	459785	0,1
Biotin carboxylase (accC)	49191	1,6
DNA-directed RNA polymerase subunit beta' (rpoC)	154863	0,4
GDP-mannose dehydrogenase (Fragment) (algD)	42482	1,9
GDP-mannose 6-dehydrogenase AlgD	48317	1,5
ATP synthase subunit alpha (atpA)	55503	1,2
Serine protease MucD	50325	1,3
Putative small heat shock protein (ibpA)	16573	3,0
Ribonuclease E (RNase E)	119389	0,3
Chaperone protein dnaJ	40715	1,3
Ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase ubiE	28285	2,6
PvdI(2) OS=Pseudomonas aeruginosa	175008	0,2
ATP synthase subunit alpha (atpA)	55459	0,7
PvdL	482414	0,1
Cell division protein ftsA	44906	0,8
Acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase	49460	0,6
Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	75598	0,4
Insulin-cleaving metalloproteinase outer membrane	47424	0,6
Fructose-bisphosphate aldolase	38741	0,9
Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase (accB)	16492	1,4
DNA polymerase III, alpha subunit (dnaE)	131446	0,2
Cell division protein ftsZ	41288	0,6
Exoenzyme S	48273	0,4
DNA mismatch repair protein mutL	69927	0,3
3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase (ubiG)	25987	1,1
Succinate dehydrogenase (A subunit)	63972	0,4
D-ala-D-ala-carboxypeptidase	42479	0,5
Type III export protein PscL	23982	1,2
50S ribosomal protein L5	20379	1,3
Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) multidrug efflux membrane fusion protein	42095	0,5
Rod shape-determining protein MreB	37145	0,6
Pyochelin synthetase (pchF)	198228	0,1
(Dimethylallyl)adenosine tRNA methyltransferase miaB	50330	0,2
Succinate dehydrogenase (B subunit)	26666	0,8
Protein-export protein secB	18183	1,2
Putative biotin carboxylase subunit of a transcarboxylase	52199	0,3
Polyphosphate kinase (ppk)	78531	0,2
L-ornithine N5-oxygenase	49986	0,4
Dihydroaeruginosic acid synthetase	157480	0,1
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	26877	0,7
Translocator protein PopB	39962	0,4
Putative exported protein	22215	0,7
Putative uncharacterized protein exsD	31680	0,5
Elongation factor Tu	43630	0,3
Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit A	48199	0,3
30S ribosomal protein S5	17662	0,9
Recombination-associated protein rdgC	34148	0,5
Pyruvate dehydrogenase (Acetyl-transferring), homodimeric type	101094	0,1
Putative uncharacterized protein	44805	0,2
UPF0176 protein PACG_05401	35782	0,4
30S ribosomal protein S8	14210	1,8
NADH-quinone oxidoreductase	99802	0,1
DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	36723	0,3
Chaperone protein dnaK	68799	0,2

## Annexes

Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	60419	0,2
Chromosome partitioning protein	28783	0,5
DNA helicase II	81550	0,1
<b>Type III secretory apparatus protein PcrD</b>	<b>77168</b>	<b>0,1</b>
NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D	68471	0,2
UDP-glucose/GDP-mannose dehydrogenase-like protein	46774	0,2
ATP synthase subunit b (atpF)	16994	0,7
ATP synthase epsilon chain (atpC)	14765	0,6
Protein-export membrane protein secF	33021	0,2
Putative cytochrome c1	29167	0,3
Protein-export membrane protein secD	67632	0,1
UvrABC system protein A	105048	0,1
Putative uncharacterized protein	9527	1,7
Cytochrome b	46138	0,1
Probable cytosol aminopeptidase	52573	0,2
PqsC	38550	0,2
Putative ABC transporter, ATP-binding protein	61331	0,1
<b>Exoenzyme T</b>	<b>48485</b>	<b>0,2</b>
<b>Regulatory protein PcrH</b>	<b>18615</b>	<b>0,6</b>
30S ribosomal protein	25822	0,4
Probable malate:quinone oxidoreductase 1	57318	0,1
Translation initiation factor IF-2	90683	0,1
DNA mismatch repair protein mutL	68819	0,1
Dihydrolipoamide dehydrogenase	50326	0,2
Cysteine synthase	49346	0,2
Probable malate:quinone oxidoreductase 2	55655	0,2
Ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase ubiE	28322	0,4
Putative uncharacterized protein	47945	0,1
Protease subunit HflC	33095	0,2
30S ribosomal protein S1	61928	0,1
Outer membrane porin F	37808	0,1
Putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	68696	0,1
Phosphoenolpyruvate synthase	86271	0,1
Transcriptional activator protein lasR	26793	0,3
Putative uncharacterized protein	57148	0,1
Long-chain-fatty-acid-CoA ligase	62129	0,1
ATP synthase gamma chain (atpG)	31677	0,2
<b>Exoenzyme S synthesis regulatory protein exsA</b>	<b>31957</b>	<b>0,2</b>
PqsB	30640	0,2
Putative uncharacterized protein	35929	0,2
Putative uncharacterized protein	69888	0,1
<b>Adenylate cyclase ExoY</b>	<b>45500</b>	<b>0,1</b>
Single-stranded DNA-binding protein	18546	0,4
Malate-quinone oxidoreductase	62209	0,1
Putative cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit II	22840	0,2
Putative short-chain dehydrogenase	47273	0,1
GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	58197	0,1
DNA-binding protein HU-beta	9081	1,1
Putative chemotaxis signal transduction protein	34449	0,2
Oxoglutarate dehydrogenase (Succinyl-transferring), E1 component	105708	0,0
DNA gyrase subunit B	90294	0,1
Cell division protein FtsH	70103	0,1
Putative transcriptional regulator, RpiR family	31852	0,1
Cysteine synthase B	32571	0,2
50S ribosomal protein L19	13024	0,7
50S ribosomal protein L19	13048	0,7
Membrane-bound lysozyme inhibitor of C-type lysozyme	13831	0,4
NADH-quinone oxidoreductase subunit N	51782	0,1
Putative cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit III	34814	0,1
Putative uncharacterized protein	80868	0,1
<b>ATP-dependent hsl protease ATP-binding subunit hslU</b>	<b>50099</b>	<b>0,1</b>
Transcription termination factor rho	47136	0,1
GDP-mannose 6-dehydrogenase	47465	0,1
Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha	35069	0,1
Elongation factor G 1	78023	0,1
Putative uncharacterized protein	22835	0,2
Putative GGDEF domain protein	74036	0,1
RecA (Fragment)	34255	0,1
Putative NADH dehydrogenase, FAD-containing subunit	42737	0,1
Fimbrial protein	16364	0,3
Transcriptional regulator RhlR	25671	0,2
<b>ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX</b>	<b>47298</b>	<b>0,1</b>
Putative Orn/Arg/Lys decarboxylase	82994	0,1
<b>Type III export apparatus protein pscB</b>	<b>15415</b>	<b>0,3</b>
Formamidopyrimidine-DNA glycosylase	30236	0,1
<b>Translocator outer membrane protein PopD</b>	<b>31332</b>	<b>0,1</b>
RNA polymerase sigma factor rpoD	69648	0,1
Putative uncharacterized protein	19057	0,2
Putative exonuclease, RdgC	35809	0,1
Putative SH3 domain protein	24156	0,2

## Annexes

Probable thioredoxin	17029	0,3
Putative uncharacterized protein	26250	0,2
Putative peroxidase	32472	0,1
Acyl-homoserine-lactone synthase	22821	0,2
Putative cytoplasmic membrane protein	29001	0,2
Chaperone protein htpG	71624	0,1
Shikimate kinase	19367	0,2
Cell division protein zipA homolog	32243	0,1
Putative membrane protein	78058	0,1
Putative two-component sensor	79792	0,1
Arginyl-tRNA synthetase	65600	0,1
Replicative DNA helicase	51605	0,1
Putative sodium/alanine symporter	51693	0,1
O-antigen chain length regulator	37276	0,1
Aspartate aminotransferase	43436	0,1
Putative zinc protease	51963	0,1
Putative uncharacterized protein	23773	0,2
Nucleoside diphosphate kinase	15630	0,3

Les fractions partiellement purifiées d'ATPase PscN ont été analysées par spectrométrie de masse dans le cadre d'une collaboration avec Alexandra Kraut et Yohann Couté du Laboratoire Edyp du CEA de Grenoble. La masse des protéines détectées ainsi que leur abondance relative dans l'échantillon, calculée en fonction de l'index d'abondance calculé selon MASCOT, sont indiqués. Les protéines surlignées en jaune appartiennent au SST3. Celles surlignées en bleu sont des contaminants biotinylés tandis que celles surlignées en vert sont impliquées dans le métabolisme de la pyoverdine. Enfin, les chaperonnes ou protéases contaminantes, ayant probablement une activité ATPase, sont surlignées en rose.

## ***Annexe 2 : Article sur l'activité de formation des pores dans des liposomes***

« Pore formation by T3SS translocators: liposome leakage assay », Faudry E., Perdu C., Attree I., Methods in Molecular Biology (2012) 966:173-85

### Résumé de l'article :

Le Système de Sécrétion de Type III (SST3) est utilisé par de nombreuses bactéries à Gram négatif pour injecter des effecteurs dans des cellules cibles. L'un des composants de ce système est le translocon, qui forme un pore protéique dans la membrane cytoplasmique de la cellule hôte pour permettre le passage des effecteurs. Cet article décrit une méthode permettant l'étude des activités de formation de pore par les protéines du translocon. Les translocateurs peuvent être purifiés, à partir de leur expression sous forme associée à leur chaperonne chez *Escherichia coli*. Leur capacité à former des pores peut être étudiée *in vitro* par un test de fuite de liposome. Un fluorochrome, la sulforhodamine-B est emprisonné à l'intérieur de liposomes. Lorsque des pores sont formés dans le liposome, ce fluorochrome est libéré dans le milieu et émet une fluorescence.

### Contribution à cet article :

Ma contribution a été de vérifier la faisabilité du protocole, de participer à la rédaction et de réaliser les diagrammes montrant les différentes étapes du protocole.

# Chapter 11

## Pore Formation by T3SS Translocators: Liposome Leakage Assay

Eric Faudry, Caroline Perdu, and Ina Attrée

### Abstract

Gram-negative bacteria utilize a dedicated membrane-embedded apparatus, the type III secretion system (T3SS), to inject proteins into host cells. The passage of the proteins across the target membrane is accomplished by a proteinaceous pore—the translocon—formed within the host-cell cytoplasmic membrane. Translocators bound to their chaperones can be expressed in *Escherichia coli* and subsequently dissociated from the chaperone by guanidine treatment. The pore formation properties of the translocators can then be studied by an in-vitro liposome leakage assay. Sulforhodamine-B is encapsulated within lipid vesicles during liposome preparation. At high concentration, this fluorochrome exhibits self-quenching limiting fluorescence emission. Upon pore formation, liposome leakage leads to the dilution of Sulforhodamine-B in the medium and fluorescence emission increases. Alternatively, fluorochromes coupled to large dextran molecules can be encapsulated in order to estimate pore dimensions. Here we describe protein expression and purification, dye-liposome preparation, and leakage assay conditions.

**Key words:** Protein expression and purification, Pore, Liposome, Lipid vesicle, LUV, Sulforhodamine-B, Fluorescence

### 1. Introduction

Pore-forming toxins are a widespread feature of bacterial poisoning, exhibiting a variety of modes of action with some common characteristics enabling their classification in different families (1, 2). Among them, the translocators of the Type III Secretion System (T3SS) display some unique traits: they are bound to a chaperone in the bacterial cytoplasm, from which they are separated for their export through the secretion needle, and then they form a pore in the host-cell membrane (3). In addition, this pore is thought to remain linked to the secretion needle and allows the passage of effector proteins.

*Pseudomonas aeruginosa* translocators PopB and PopD are present in the bacterial cytosol in complex with their chaperone PcrH, and PopB/PcrH and PopD/PcrH complexes can be expressed in a heterologous system and purified. Upon secretion by the T3SS, the chaperone-translocators complexes are dissociated and the chaperone remains in the bacterial cytosol (4). This dissociation of the complexes can be promoted in vitro with the recombinant proteins by lowering the pH or by addition of chaotropic salts. This last procedure is preferable because it prevents spontaneous aggregation which is a propensity of these intrinsically partially folded proteins (5–9). We describe here the conditions for heterologous expression as well as the purification and dissociation of the complex. An expression vector was engineered in order to add a hexa-His tag to the chaperone, allowing purification of the complex under native conditions and the separation from the untagged translocators under denaturing conditions (Fig. 1). The prepared translocators then display reproducible and consistent pore-forming properties.

In the study of protein activity directed towards membranes, liposomes (reconstituted lipid vesicles) are an invaluable tool for the deciphering of membrane binding, oligomerization within the membrane and pore formation (10). Liposomes can be composed of multiple concentric lipid bilayers (Multilamellar Lipid Vesicle or MLV) or a single membrane (unilamellar vesicles). Such vesicles can be classified according to their dimensions into Giant, Large or Small Unilamellar Vesicles (GUV, LUV, and SUV; respectively) (11). The size of the vesicles determines membrane curvature but also relates to vesicle stability, with LUVs of diameters ranging from 80 to 200 nm displaying optimum stability.

Upon dispersion in an aqueous solution, phospholipids spontaneously assemble into vesicles. Different techniques may be employed to achieve vesicle formation in buffer: sonication, detergent removal, hydration at appropriate temperatures combined or not with freeze-thaw cycles, and reverse phase evaporation. Sonication directly leads to SUVs formation whereas the other techniques generally give MLVs that should be subsequently transformed into LUVs by extrusion through filters of controlled porosity. On the other hand, GUVs are generally obtained by electroformation or blister formation (12, 13).

Here we describe a technique for obtaining LUVs by reverse phase evaporation and their utilization to evaluate pore forming activity of T3SS translocators. During vesicle formation, the fluorochrome Sulforhodamine-B is entrapped at high concentration. At this concentration, fluorescence emission is limited by self quenching. When a pore is formed in the vesicle membrane, dye release and dilution in the external buffer leads to an increase in fluorescence that can be monitored by fluorescence spectroscopy.

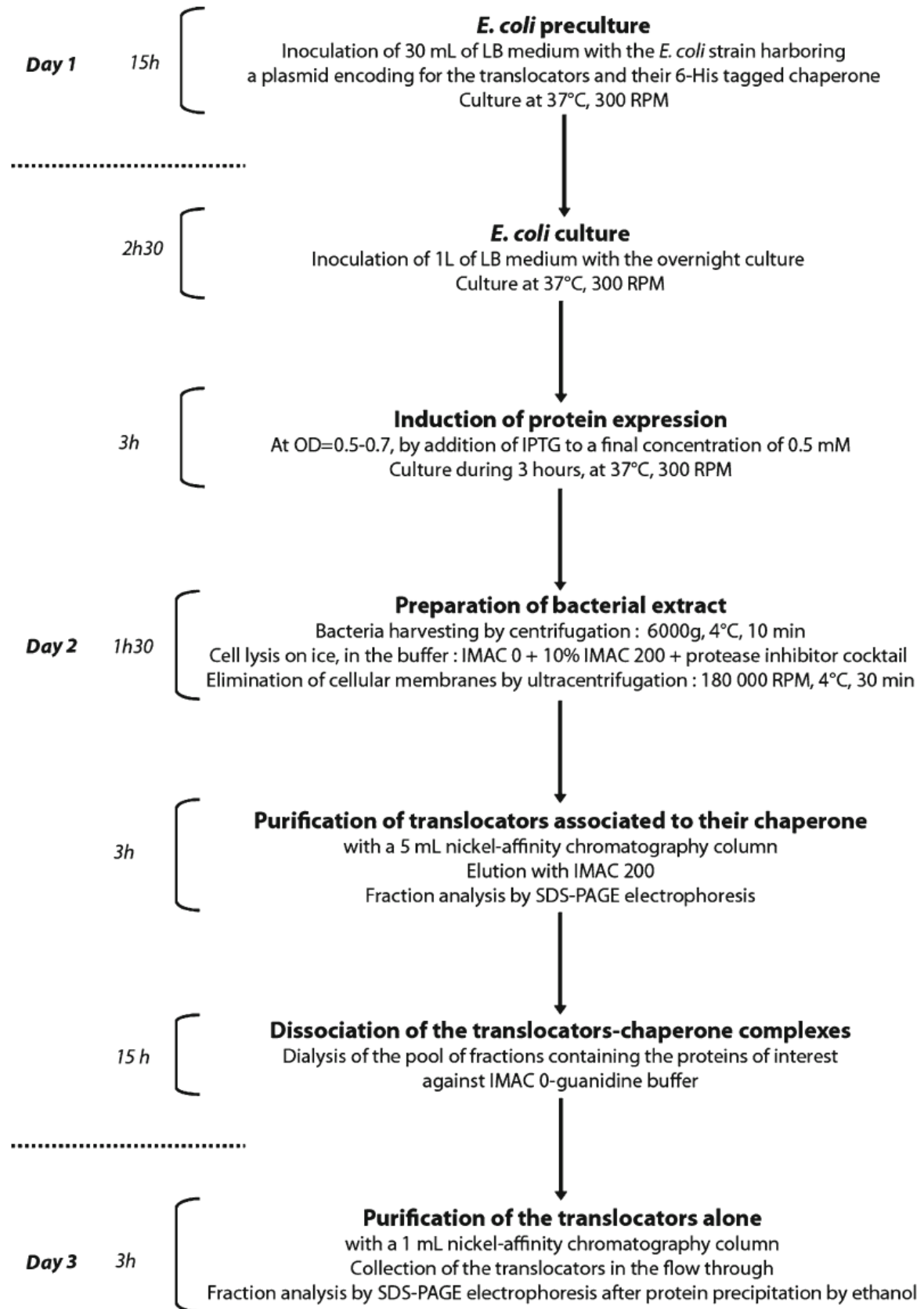


Fig. 1. Diagram of the expression and purification of translocators.



176 E. Faudry et al.

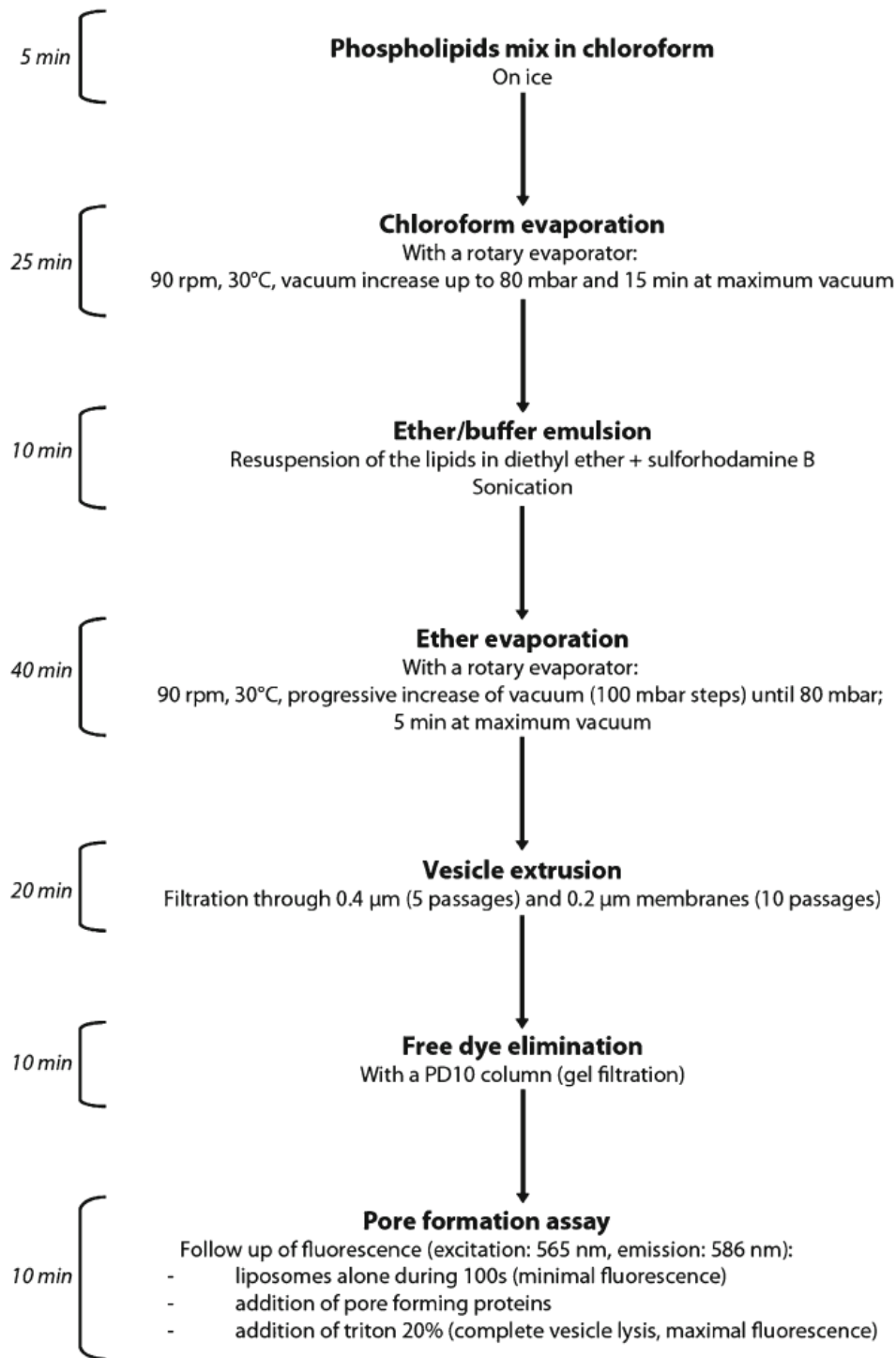


Fig. 2. Diagram of the vesicle preparation and pore formation assay.

The main steps are: evaporation of the chloroform from the lipid mixture; formation of an emulsion with diethyl ether, lipids and buffer; elimination of diethyl ether by controlled evaporation; vesicle extrusion; free dye elimination and dye release from the vesicles by fluorescence monitoring (Fig. 2).

Different fluorochromes can be encapsulated within the LUVs. Sulforhodamine-B displays a high quantum yield allowing high sensitivity and fluorescence properties fairly insensitive to pH and buffer composition. Thus, this assay can be successfully used for the study of pore forming proteins in general and T3SS in particular (6, 14, 15).

## 2. Materials

### 2.1. Translocator Expression and Purification

1. *E. coli* expression strain harboring a plasmid designed for the co-expression of a T3SS translocator and its chaperone. The chaperone coding sequence must be fused to a hexa-His tag (see Note 1).
2. LB medium: 10 g/l Tryptone, 5 g/l Yeast Extract, 10 g/l NaCl. For culture, use 30 ml in a 100-ml Erlenmeyer flask, or 1 l in a 3-l Erlenmeyer flask, or 2 × 500 ml in two 2-l Erlenmeyer flasks.
3. Orbital shaker.
4. 100 mM IPTG (isopropyl-beta-d-thiogalactopyranoside): add 119 mg to 5 ml of deionized water. Sterilize by filtration through a 0.22 µm membrane.
5. Kanamycin.
6. Spectrophotometer to measure optical density at 600 nm.
7. Ultracentrifuge and associated rotors.
8. IMAC-0 buffer: 25 mM HEPES, pH 8.0, 500 mM NaCl. Make 250 ml and filter through a 0.22 µm membrane.
9. IMAC-200 buffer: IMAC-0 supplemented with 200 mM Imidazole. Make 200 ml and filter through a 0.22 µm membrane.
10. Protease inhibitor cocktail without chelating agent.
11. 50 mM NiSO<sub>4</sub> solution. Make 70 ml.
12. IMAC-0-guanidine buffer: 25 mM HEPES, pH 8.0, 6 M guanidine hydrochloride. Make 250 ml and filter through a 0.22 µm membrane.
13. IMAC-200-guanidine buffer: IMAC-0-guanidine supplemented with 200 mM Imidazole. Make 200 ml and filter through a 0.22 µm membrane.
14. 5 and 1-ml metal affinity chromatography columns.
15. Low pressure liquid chromatography apparatus.
16. Dialysis bag with 10–12 kDa cut-off.
17. French Press, sonicator, or another cell-disrupting apparatus.
18. Ethanol.

**2.2. Vesicle Preparation and Extrusion**

The volumes and quantities are given to produce 3 ml of vesicles at a global lipid concentration of 20 mM.

1. Standard rotary evaporator with vacuum and bath temperature control.
2. 50 ml spherical evaporation flask.
3. Phospholipids in chloroform (10–40 mg/ml), stored under argon or nitrogen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The average molecular weights of natural lipids are indicated by the manufacturer.
4. Chloroform (analytical grade).
5. Diethyl ether (analytical grade).
6. Tris solution: 25 mM Tris-HCl pH 8.0. Make 50 ml.
7. Sulforhodamine-B (see Note 2) solution: 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM Sulforhodamine-B. Make 3 ml.
8. Sonicator.
9. 5-ml hemolysis tube or equivalent.
10. 5-ml standard plastic syringe.
11. Steel Syringe Type Holder.
12. 0.4 and 0.2  $\mu\text{m}$  Nucleopore Polycarbonate membranes (13 mm diameter) (see Note 3).
13. Desalting gravity column.

**2.3. Dye Leakage Fluorescence Assay**

1. Fluorimeter.
2. Quartz cell for fluorescence measurement (1-cm path length) with 3–4 mm magnetic bar for stirring.
3. 20% Triton-X 100 solution in water. Make 1 ml.

---

**3. Methods****3.1. Translocator Expression and Purification**

The conditions for expression are described for *P. aeruginosa* T3SS translocators using the BL21(DE3)Star *E. coli* strain and expression plasmids based on pET-30b (Kan<sup>r</sup>). Conditions need to be adapted to each specific translocator (see Note 1).

1. At the end of the afternoon of Day 1, inoculate 30 ml of LB medium supplied with kanamycin (50  $\mu\text{g}/\text{l}$ ) with one colony of *E. coli* expression strain harboring the bi-cistronic plasmid. Grow overnight at  $37^{\circ}\text{C}$  under orbital shaking (300 rpm).
2. Early on Day 2, inoculate 1 l of LB medium supplied with kanamycin (50  $\mu\text{g}/\text{l}$ ) with the overnight culture (use the whole 30 ml of the overnight culture with an OD usually above 2.5). Incubate at  $37^{\circ}\text{C}$  under orbital shaking (300 rpm).

3. When the OD measured at 600 nm is between 0.5 and 0.7, add IPTG to the culture at a final concentration of 0.5 mM and further incubate for 3 h.
4. Harvest the cells by centrifugation at  $6,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , for 10 min and resuspend them on ice in 30 ml of IMAC-0 supplemented with 10% of IMAC-200 (final concentration of imidazole: 20 mM) and the protease inhibitor cocktail at the concentration recommended by the manufacturer.
5. Disrupt the cells using a French Press at 13,000 psi, three passages (see Note 4). The suspension has to be kept as cold as possible and completion of disruption can be assessed by analyzing the OD at 600 nm that should decrease and reach a plateau.
6. Clear the suspension by ultracentrifugation at  $180,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , for 30 min.
7. During ultracentrifugation, equilibrate a 5-ml metal affinity chromatography column by successively applying 50 ml of  $\text{H}_2\text{O}$ , 50 ml of 50 mM  $\text{NiSO}_4$ , and 50 ml of IMAC-0 supplemented with 10% of IMAC-200. Use a flow rate of 5 ml/min.
8. Load the clarified-supernatant on the equilibrated column at 4 ml/min. Load again the flow-thru solution to maximize binding of the proteins of interest.
9. Wash the column with 10 ml of IMAC-0 supplemented with 25% of IMAC-200 to elute nonspecifically bound proteins.
10. Elute the translocators complexed to their 6His-tagged chaperone with 40 ml of IMAC-200. Collect 2-ml fractions.
11. Analyze the fractions by standard SDS-PAGE and pool the fractions with the highest concentration and purity. Make pools of 4–6 ml.
12. Dialyze the pooled-fractions overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  against IMAC-0-guanidine buffer. The volume of dialysis should be nine times the total volume of the fractions in order to reach a final concentration at the end of dialysis of 25 mM HEPES, 50 mM NaCl, 5.4 M Guanidine, 20 mM Imidazole (see Note 5).
13. On Day 3 equilibrate the 1-ml column as in step 7, except that IMAC-guanidine buffers should be used instead of IMAC buffers with volumes of 10 ml instead of 50 ml and a flow rate of 1 ml/min.
14. Subsequently load the dialyzed fractions at 0.5 ml/min in a closed-loop configuration, by connecting the column outlet to the sample-containing tube.
15. Disconnect the closed loop and collect the flow-thru by pumping IMAC-0-guanidine supplemented with 10% of IMAC-200-guanidine. The flow-thru sample should now contain the free translocator, while the 6His-tagged chaperone remains trapped in the column.



16. Fractions can be analyzed by SDS-PAGE after ethanol-precipitation (see Note 6).
17. Determine protein concentration by absorbance measurement at 280 nm using calculated extinction coefficients.
18. Samples should be stored at 4°C and used within 1 month. A 50-fold dilution is sufficient to provide spontaneous refolding of the T3SS translocators and membrane permeabilizing activity.

### **3.2. Vesicle Preparation and Extrusion**

The liposome preparation is described for vesicles made of egg-phosphatidylcholine and soy-phosphatidylserine (8/2; mol/mol), but other lipid composition can be adapted with various lipids (phospholipids, cholesterol, sphingomyelin...) and molar ratios.

1. In a 50 ml evaporation flask kept on ice, introduce 3.70 ml of 10 mg/ml phosphatidylcholine in chloroform and 0.96 ml of 10 mg/ml phosphatidylserine in chloroform.
2. Set the water bath temperature of the rotary evaporator to 30°C.
3. Connect the evaporation flask to the rotary evaporator, and start rotation at 90 rpm. Gradually increase the vacuum to maximal setting, avoiding solvent boiling.
4. Maintain evaporation for 15 min. After evaporation, a white film of lipids should be present on the flask wall and no chloroform odor should be noticed.
5. With the flask on ice, introduce 1.5 ml of diethyl ether in the evaporation flask to dissolve the lipids.
6. Subsequently introduce 1.5 ml of the Sulforhodamine-B solution (see Note 7). Vortex the flask energetically for 10 s.
7. Using a 3-mm probe, sonicate the biphasique mixture inside the evaporation flask in order to produce a homogeneous emulsion (see Note 8). The power and duration of sonication may vary according to the apparatus (see Note 9).
8. Immediately connect the evaporation flask to the rotary evaporator with the water bath temperature set at 30°C.
9. Start the rotation at 90 rpm and subsequently set the vacuum to 900 mbar. Gradually and slowly increase the vacuum in a step-wise fashion. Typically, the pressure is reduced by 100 mbar every 3 min until it reaches the minimum of 80 mbar (see Note 10).
10. Maintain maximal vacuum for 5 min. A dark (due to the Sulforhodamine-B color), fairly viscous and homogeneous solution should be obtained.
11. Transfer the vesicle solution to a 5-ml plastic hemolysis tube and wash the wall of the evaporation flask with 1.5 ml of

Sulforhodamine-B solution. Mix the two solutions in the hemolysis tube.

12. Insert a 0.4  $\mu\text{m}$  Nucleopore Polycarbonate membrane in a steel Syringe Type Holder with the shiny side of the membrane oriented towards the inlet of the holder. Tightly close the assembly.
13. Push the vesicle suspension through the membrane with a 5-ml plastic syringe and subsequently push air to collect the solution remaining inside the filter holder. Fill the syringe with the filtered suspension and repeat this step for a total of five passages (see Note 11).
14. Repeat steps 12 and 13 two times with new 0.2  $\mu\text{m}$  filters. Passages through the filter should become easier. The extrusion with a total of 15 passages through the filters results in monodispersed Large Unilamellar Vesicles (LUVs) of the expected size.
15. Equilibrate the desalting column (see Note 12) with 25 ml of Tris solution, according to manufacturer's instructions.
16. Load 1 ml of LUV suspension on the column and elute with Tris solution (see Note 13).
17. The final LUV suspension should be stored at 4°C, protected from light, and used within 5 days. We typically obtain LUVs with a radius of  $90 \pm 2$  nm and a polydispersity of 7%, as determined by Dynamic Light Scattering.

### **3.3. Dye Leakage Fluorescence Assay**

1. The fluorimeter should be used in kinetics mode, with excitation at 565 nm and emission at 586 nm. Homogeneous magnetic stirring should be provided.
2. Introduce in the quartz cell the buffer of choice (see Note 14) and the vesicle preparation at a final concentration of lipids of 10  $\mu\text{M}$  in 2 ml.
3. Start fluorescence recording for baseline measurement.
4. After 100 s introduce the purified pore-forming proteins (see Note 15) without stopping the fluorescence recording. The proteins could be introduced either as refolded proteins by prior dilution in a buffer devoid of guanidine, or as unfolded proteins in guanidine directly introduced as a small volume in the vesicle solution, provided that the final concentration of guanidine falls below 100 mM.
5. At the end of the recording, add 40  $\mu\text{l}$  of the 20% Triton-X 100 solution in order to measure the fluorescence maximum, due to full leakage of the encapsulated dye. This value reflects the exact quantity of vesicle used in the assay. A typical recording is shown in Fig. 3.

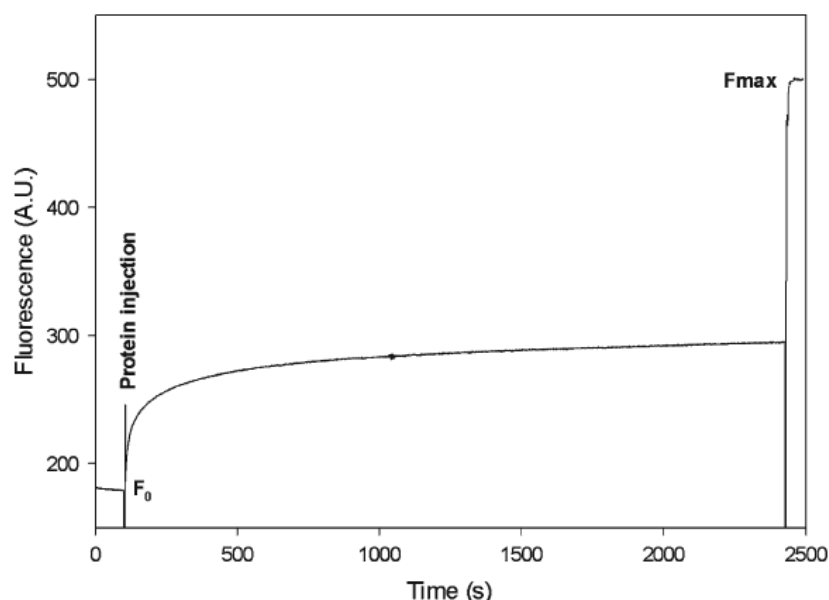


Fig. 3. Typical recording from a pore formation assay. Dye efflux was monitored by fluorescence measurement after the addition (at 100 s) of a 10 nM equimolar mixture of PopBD to a 2 ml suspension of 10  $\mu$ M LUV. At the end of the kinetics recording, Triton-X 100 was introduced in the solution at a 0.4% final concentration to induce maximum dye release. The fluorimeter settings were: excitation at 565 nm, emission at 586 nm with slits of 3 nm and 5 nm, respectively.

6. The baseline and maximum fluorescence measurements allow fluorescence normalization using the following equation:

$$F(t)_{\text{norm}} = (F(t) - F_0) / (F_{\text{max}} - F_0).$$

Where  $F_0$  is the baseline fluorescence level before protein addition and  $F_{\text{max}}$  is the level after addition of 20% Triton-X 100 at the end of each assay.

7. For quantitative comparisons of kinetics measurements, end-plateau levels, initial rates or other kinetics parameters can be considered depending on the properties of the protein of interest.

#### 4. Notes

1. *E. coli* strain, plasmid construction and expression conditions should be tested and optimized for each translocator–chaperone pair. The protocol gives general guidelines based on our experience with *P. aeruginosa* T3SS translocators (5, 6, 8, 9) and pET-30b.
2. For estimation of pore size, dextran-FITC of different hydrodynamic radii can be entrapped within the vesicles (6). In this case, the dye concentration should be adapted.

3. Membranes with other pore sizes can be used, depending on the desired diameter of the LUVs to be prepared.
4. A sonicator or another cell-disrupting device can also be used. Conditions used to break the bacteria depend on each device.
5. For *P. aeruginosa* translocators, a final concentration after dialysis of 5.4 M Guanidine was shown to be sufficient to dissociate the translocator–chaperone complex. The final 20 mM Imidazole prevents nonspecific retention of the translocator on the chromatography column, while enabling the retention of the 6His-tagged chaperone.
6. Precipitation of concentrated proteins can be carried out as follows: mix 50 µl of sample with 450 µl of cold absolute ethanol. Incubate overnight (or at least 1 h) at  $-20^{\circ}\text{C}$  and centrifuge for 20 min at  $14,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ . Wash the pellet with 500 µl Ethanol 90% and centrifuge again in the same conditions. Air-dry the pellets and dissolve the proteins in 50 µl Laemmli sample buffer 1 $\times$ .
7. The dark coloration due to Sulforhodamine-B precludes the direct observation of the solution turbidity and homogeneity which is an indication of the presence of lipid suspension and vesicle formation. Thus, one could omit Sulforhodamine-B in a first try of the technique in order to facilitate the monitoring of each step.
8. During sonication, the flask must be kept on ice and the probe must not touch the glass wall to avoid flask rupture or uneven sonication.
9. For example, we use a 550 W sonicator XL (Misonix) set at 30% power in three pulses of 15 s separated by 5 s on ice.
10. This is the critical point of the procedure: vacuum and temperature should be set in order to avoid any boiling of the solution in the evaporation flask. Boiling would prevent homogeneous evaporation and vesicle formation. The first steps of ether evaporation (i.e., until the pressure decreases to 600 mbar) can be performed without immersion of the flask in the water bath. The evaporation flask can be put at  $30^{\circ}\text{C}$  at the end of a step of increased vacuum. The viscosity of the solution first increases and then decreases. Every step of increased vacuum should be maintained until no modification of the aspect of the solution is observed. A very viscous solution with apparent heterogeneity can be observed at one step with some lipid mixture but should revert to a homogeneous turbid solution at higher vacuum settings.
11. The first passages thru the filter usually require a strong pressure on the syringe. Be careful to firmly tighten the filter holder and the syringe. The filter holder could be set on top of the hemolysis tube to push vertically on the syringe. Alternatively, a



dedicated extrusion device from Avanti Polar could be used. The filter can get plugged after the first passage: in this case, use a new filter. Moreover, gloves are recommended for this filtration step as small amounts of colored solution could leak between the filter holder and the syringe.

12. When entrapping dextran-FITC of large size (superior to 20 kDa), a gel filtration column with higher exclusion limit should be used. Otherwise, free dextran-FITC would elute in the void volume along with the vesicles.
13. Because of their large size, LUVs elute prior to free Sulforhodamine-B. Only the concentrated (darker) fractions are collected in a 2-ml microfuge tube while the lighter fractions at the beginning and the end of the peak are discarded. Dilution of the vesicles during this step should be taken into consideration in order to estimate the final concentration. Alternatively, lipid concentration can be determined with a phosphorus assay.
14. Buffer composition can be adjusted to test the effects of pH, salts or other additives. Sulforhodamine-B fluorescence is usually not influenced by buffer composition, in particular by changes in pH.
15. Protein concentrations may vary from 1 to 100 nM according to the protein binding affinity for vesicle and pore activity. Lipid-protein ratio should be high enough to ensure that most of the protein binds to the vesicles. Otherwise, liposome leakage would reflect pore activity as well as partition between buffer and vesicle. Binding affinity should be estimated by titration using ultracentrifugation or other binding assay.

---

## Acknowledgments

The work in our lab is supported in part by CEA-DSV programs and the French cystic fibrosis association “Vaincre la Mucoviscidose.” The authors are grateful to Michel Ragno for optimization of expression and purification procedures, and to Vincent Forge and Grégory Vernier for helpful discussions and technical help to set up the vesicle protocol.

## References

1. Parker MW, Feil SC (2005) Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol* 88:91–142
2. Tilley SJ, Saibil HR (2006) The mechanism of pore formation by bacterial toxins. *Curr Opin Struct Biol* 16:230–236
3. Mueller CA, Broz P, Cornelis GR (2008) The type III secretion system tip complex and translocon. *Mol Microbiol* 68:1085–1095
4. Cornelis GR (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4: 811–825

5. Faudry E, Job V, Dessen A et al (2007) Type III secretion system translocator has a molten globule conformation both in its free and chaperone-bound forms. *FEBS J* 274:3601–3610
6. Faudry E, Vernier G, Neumann E et al (2006) Synergistic pore formation by type III toxin translocators of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 45:8117–8123
7. Romano FB, Rossi KC, Savva CG et al (2011) Efficient isolation of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion translocators and assembly of heteromeric transmembrane pores in model membranes. *Biochemistry* 50:7117–7131
8. Schoehn G, Di Guilmi AM, Lemaire D et al (2003) Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. *EMBO J* 22:4957–4967
9. Wager B, Faudry E, Attree I, et al. (2012) Pore properties of the type III secretion system translocon of *Pseudomonas aeruginosa*, Submitted.
10. Dalla Serra M, Menestrina G (2003) Liposomes in the study of pore-forming toxins. *Methods Enzymol* 372:99–124
11. Lasic DD (1988) The mechanism of vesicle formation. *Biochem J* 256:1–11
12. Delcour AH, Martinac B, Adler J et al (1989) Modified reconstitution method used in patch-clamp studies of *Escherichia coli* ion channels. *Biophys J* 56:631–636
13. Meleard P, Bagatolli LA, Pott T (2009) Giant unilamellar vesicle electroformation from lipid mixtures to native membranes under physiological conditions. *Methods Enzymol* 465:161–176
14. Agafonov A, Gritsenko E, Belosludtsev K et al (2003) A permeability transition in liposomes induced by the formation of Ca<sup>2+</sup>/palmitic acid complexes. *Biochim Biophys Acta* 1609:153–160
15. Galloux M, Vitrac H, Montagner C et al (2008) Membrane Interaction of botulinum neurotoxin A translocation (T) domain. The belt region is a regulatory loop for membrane interaction. *J Biol Chem* 283:27668–27676

***Annexe 3 : Article sur la caractérisation structurale et la localisation membranaire de la protéine ExsB du SST3 de P. aeruginosa***

« Structural characterization and membrane localization of ExsB from the Type III Secretion System (T3SS) of *Pseudomonas aeruginosa* », Izoré T., Perdu C., Job V., Attree I., Faudry E., Dessen A., Journal of Molecular Biology (2011) 413(1):236-246

Résumé de l'article :

Parmi son arsenal de facteurs de virulence, la bactérie pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* utilise un Système de Sécrétion de Type III (SST3) pour injecter des toxines directement dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. La protéine ExsB, dont le gène est localisé dans l'opéron de régulation du SST3, présente une forte homologie de séquence avec YscW, une lipoprotéine de *Yersinia spp.* de la famille des pilotines, impliquée dans la localisation et la stabilisation de l'anneau de la membrane externe du SST3. Cet article montre pour la première fois que la protéine ExsB est bien exprimée par *P. aeruginosa* lorsque le SST3 est induit. Elle est de plus associée à la membrane externe de la bactérie. La structure de cette petite protéine de 15,6 kDa a été résolue par cristallographie aux rayons X. La protéine ExsB arbore un repliement en sandwich et présente une région basique qui pourrait participer à l'ancrage membranaire. Sa structure est très distincte d'autres pilotines impliquées dans l'assemblage des sécrétines, c'est-à-dire dans l'assemblage des anneaux de la membrane externe de différents systèmes de sécrétion : SST2, SST3, pili de type IV.

Contribution à cet article :

Ma contribution a été de caractériser la protéine ExsB *in vivo*, dans *P. aeruginosa*, en étudiant son expression et sa localisation.



## Structural Characterization and Membrane Localization of ExsB from the Type III Secretion System (T3SS) of *Pseudomonas aeruginosa*

Thierry Izoré<sup>1,2,3</sup>, Caroline Perdu<sup>2,3,4,5</sup>, Viviana Job<sup>1,2,3</sup>,  
Ina Attree<sup>2,3,4,5</sup>, Eric Faudry<sup>2,3,4,5</sup> and Andréa Dessen<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Bacterial Pathogenesis Group, Institut de Biologie Structurale (IBS), Université Grenoble I, France

<sup>2</sup>Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), IBS and iRTSV, France

<sup>3</sup>Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), IBS and ERL5261, France

<sup>4</sup>Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses Group, iRTSV, Université Grenoble I, France

<sup>5</sup>INSERM U1036\_S, Grenoble, France

Received 23 May 2011;  
received in revised form  
20 July 2011;  
accepted 21 July 2011  
Available online  
4 August 2011

Edited by R. Huber

### Keywords:

type III secretion;  
infection;  
secretin;  
lipoprotein;  
X-ray crystallography

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic human pathogen that employs a finely tuned type III secretion system (T3SS) to inject toxins directly into the cytoplasm of target cells. ExsB is a 15.6-kDa protein encoded in a T3SS transcription regulation operon that displays high sequence similarity to YscW, a lipoprotein from *Yersinia* spp. whose genetic neighborhood also involves a transcriptional regulator, and has been shown to play a role in the stabilization of the outer membrane ring of the T3SS. Here, we show that ExsB is expressed in *P. aeruginosa* upon induction of the T3SS, and subcellular fractionation studies reveal that it is associated with the outer membrane. The high-resolution crystal structure of ExsB shows that it displays a compact  $\beta$ -sandwich fold with interdependent  $\beta$ -sheets. ExsB possesses a large patch of basic residues that could play a role in membrane recognition, and its structure is distinct from that of MxiM, a lipoprotein involved in secretin stabilization in *Shigella*, as well as from those of Pil lipoproteins involved in pilus biogenesis. These results reveal that small lipoproteins involved in formation of the outer membrane secretin ring display clear structural differences that may be related to the different functions they play in these systems.

© 2011 Published by Elsevier Ltd.

## Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen, the causative agent of a high number of nosocomial infections, and a particular threat for cystic fibrosis patients, whose lungs it colonizes upon formation of a biofilm. In addition, *P. aeruginosa* is highly resistant to antibiotic treatment due to the action of efflux pumps as well as resistance plasmids carried naturally.<sup>1</sup> Much like several other Gram-negative bacteria, it uses a type III secretion system (T3SS), a needle-like apparatus composed of more than 20 proteins whose function

\*Corresponding author. Bacterial Pathogenesis Group, Institut de Biologie Structurale (IBS), Université Grenoble I, France. E-mail address: [andrea.dessen@ibs.fr](mailto:andrea.dessen@ibs.fr).

Abbreviations used: T3SS, type III secretion system; OMR, outer membrane ring; EGTA, ethylene glycol bis( $\beta$ -aminoethyl ether) *N,N'*-tetraacetic acid; MBP, maltose-binding protein; SAD, single anomalous dispersion; ESRF, European Synchrotron Radiation Facility; DDM, dodecyl maltoside.



is to inject toxins directly into the cytoplasm of target cells (Fig. 1a).<sup>2-6</sup> Toxin effects include cytoskeletal disruption, permeabilization of the host cell membrane, and oncosis.<sup>7-9</sup>

Over the last few years, considerable efforts have been made to structurally and functionally characterize the components of the T3SS in order to further

the understanding of its biogenesis, assembly, and toxin secretion processes.<sup>2,10,11</sup> One main interest has been the characterization of the basal body, which is composed of two membrane-imbedded rings that span both bacterial bilayers. Notably, the outer membrane ring (OMR) is formed by the secretin (PscC in Fig. 1a), an oligomeric protein

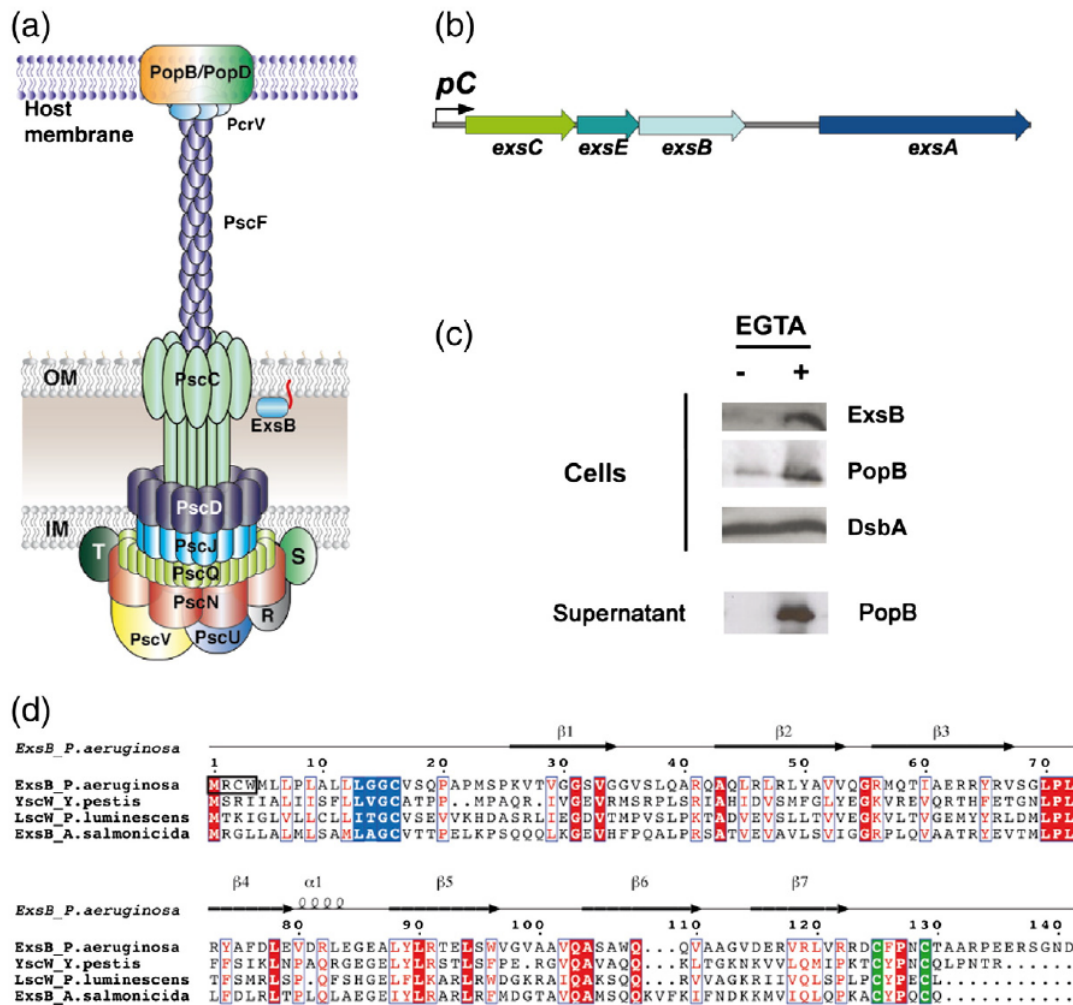


Fig. 1. ExsB is expressed by induction of the T3SS of *Pseudomonas*. (a) Schematic diagram of the T3SS of *P. aeruginosa*.<sup>2</sup> While the inner membrane harbors superposed rings and a number of associated proteins, the OMR is composed of a single oligomeric protein, the PscC secretin. (b) The *exsCEBA* operon is composed of four genes under the control of the *pC* promoter. Of note, the beginning of the *exsB* gene overlaps with the end of the *exsE* upstream gene. (c) ExsB is expressed in *P. aeruginosa*. Bacteria were grown under T3SS-non-inducing (EGTA-) or T3SS-inducing (EGTA+) conditions. Cells and supernatants were analyzed for the presence of ExsB, PopB (a T3SS translocator protein) and DsbA (loading control). As expected, under conditions of T3SS induction, PopB is secreted (bottom), and its cytoplasmic pool is increased. An increase in ExsB production is also observed under calcium depletion conditions. (d) Sequence alignment of ExsB homologs in *P. aeruginosa*, *Yersinia pestis*, *Photobacterium luminescens* and *Aeromonas salmonicida*. Identical residues are shown with a red background, whereas similar residues are shown in red. Conserved cysteines are highlighted in green, whereas the lipobox residues are shown with a blue background. The black rectangle encompasses the four additional residues in *P. aeruginosa* that should now be considered as part of the full-length sequence and include the "new" start codon. Secondary structure elements visualized in the ExsB structure are indicated above the sequences.

harboring between 12 and 14 subunits that generates a central pore big enough to allow the passage of partially folded proteins.<sup>12–15</sup> Secretins often require accessory lipoproteins (some of which are termed “pilots”) that allow their outer membrane localization and promote the stability of their oligomeric form, as is the case for InvH from the T3SS of *Salmonella enterica*, which is required for the proper localization of the secretin InvG.<sup>16–19</sup> Such associations have also been described in type IV pili<sup>20–22</sup> and T2SS, the latter of which includes the well-studied PulS pilin from *Klebsiella oxytoca*, which promotes localization and stability of the secretin PulD.<sup>23–25</sup> MxiM from *Shigella flexneri*, which stabilizes the T3SS secretin MxiD, has been structurally and biochemically characterized,<sup>26–28</sup> but its classification as a *bona fide* pilin is still a matter of controversy due to the involvement of an inner membrane lipoprotein (MxiJ) in MxiD stabilization.<sup>29</sup> It is of note that although pilot proteins from different systems display low sequence identities, they have been described as sharing key features such as low molecular weight, high pI, and a lipidation/maturation site at their N-terminus characterized by a specific consensus motif [the lipobox; (V/L)XXC<sup>30</sup>]. Interestingly, systems that lack these dedicated lipoproteins can possess secretins that carry a lipidated N-terminus, which is the case of HxcQ, a key component of the T2SS of *P. aeruginosa*, which promotes its self-piloting to the outer membrane.<sup>31</sup>

The T3SS of *Yersinia* spp. requires the outer membrane lipoprotein YscW to promote outer membrane targeting and oligomerization of the secretin YscC. The absence of YscW reduces the oligomerization level of YscC, and under conditions of YscC overexpression, its outer membrane targeting is impaired. Interestingly, a nonlipidated form of YscW is nonfunctional, being unstable and potentially unable to correctly localize overexpressed YscC; these results suggest that YscW plays the role of pilin for YscC.<sup>16</sup> Notably, YscW shares approximately 60% sequence similarity (26% identity) with ExsB, which is encoded by the *P. aeruginosa* regulatory operon *exsCEBA* (Fig. 1b), and Psc and Ysc T3SS form a closely related gene clade.<sup>32</sup> ExsB was predicted to be a 15.6-kDa, 141-amino-acid protein with a pI of 9.43 carrying a classic LXGC lipidation site and a type II signal peptide<sup>33</sup> within residues 1–16 (Fig. 1d), much like YscW. These observations initially suggested that ExsB could be the functional homolog of YscW in the *Pseudomonas* T3SS system.<sup>16,34</sup> Interestingly, an even greater similarity (73%; sequence identity 56%) was identified between ExsA and VirF, proteins encoded by genes immediately downstream from *exsB* and *yscW* in *Pseudomonas* (Fig. 1b) and *Yersinia*, respectively; their carboxy termini are almost identical.<sup>34</sup> ExsA and VirF are members of the AraC/XylS family of

transcriptional regulators and are involved in the protein interaction cascade that couples secretion activity and transcriptional activation in T3SS systems.<sup>35,36</sup> These observations suggest that there may be a number of functional/regulatory similarities within these systems in these pathogens.

The potential role played by ExsB in T3SS functionality, however, has been controversial, since *exsB* was originally reported as being a non-translated gene in *P. aeruginosa*.<sup>37</sup> In order to clarify this point and explore the biological function of ExsB, we investigated and validated its synthesis in *P. aeruginosa* under T3SS-inducing conditions, determined its subcellular localization, and solved its high-resolution crystal structure. ExsB is an outer membrane protein that displays a novel fold that is distinct from those of other secretion- or pilus-related lipoproteins that have been previously structurally characterized. ExsB folds into a  $\beta$ -sandwich and displays a highly charged region that could potentially be involved in outer membrane recognition or binding of partner proteins. These results shed light on the function of ExsB/YscW in secretion systems and reveal that structural characteristics of other lipoproteins involved in assembly of outer membrane complexes are likely to be system dependent.

## Results and Discussion

### ExsB is expressed in *P. aeruginosa* and fractionates to the outer membrane

ExsB is encoded in a locus that controls the synthesis of the ExoS toxin and other T3SS components (Fig. 1b), and initial attempts by Goranson *et al.* to detect its expression in *P. aeruginosa* were unsuccessful.<sup>37</sup> Here, employment of an upstream GTG start codon, leading to the addition of four residues at the N-terminus of the predicted ExsB sequence (Met-Arg-Cys-Trp, Fig. 1d), yielded an ExsB form that was clearly expressed in *Escherichia coli*, which allowed us to purify the protein and generate specific antibodies directed toward ExsB. In order to confirm the expression of ExsB in *P. aeruginosa*, we prepared whole-cell extracts and blotted protein content with anti-ExsB antibodies. ExsB was clearly detected in *P. aeruginosa* cell extracts (Fig. 1c) and migrates with an approximate molecular mass of 15 kDa, as predicted from the sequence (Fig. 1d). Induction of protein expression was detected both for ExsB and for T3SS translocator PopB, used here as a positive control, when cultures were grown under  $\text{Ca}^{2+}$  depletion conditions [ $+$ ethylene glycol bis( $\beta$ -aminoethyl ether) *N,N'*-tetraacetic acid (EGTA)], known to induce T3SS operons *in vitro*.<sup>38</sup>



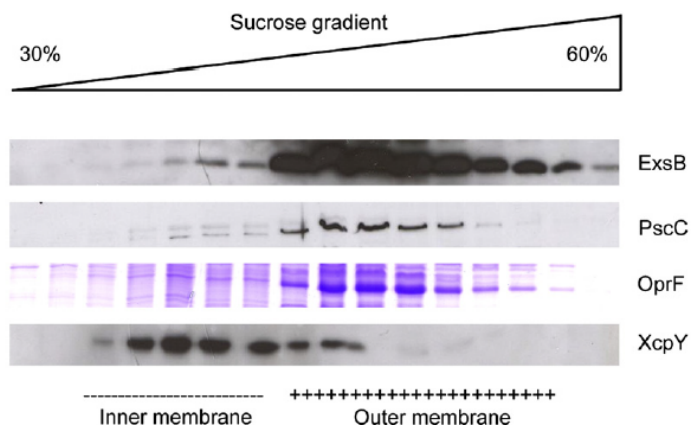


Fig. 2. ExsB and PscC localize to the outer membrane. Membranes of the clinical *P. aeruginosa* CHA strain were separated on a sucrose gradient, and protein content was analyzed by Western blot with antibodies directed against ExsB and PscC. The major porin OprF (visualized by Coomassie staining) and XcpY (Western blot) were used to identify outer and inner membranes, respectively. Note that ExsB co-localizes with the secretin PscC.

The N-terminal sequence of ExsB displays one charged amino acid followed by a stretch of hydrophobic/uncharged residues, which is the characteristic signature of a signal peptide. This sequence is followed by the LXGC motif (blue box in Fig. 1d), indicative of a lipoprotein processing site, suggesting that ExsB could be associated with the membrane through its lipid recognition sequence. For identification of the cellular localization of ExsB, inner and outer membranes of a highly cytotoxic *P. aeruginosa* strain (CHA, originally isolated from a cystic fibrosis patient) were separated by sucrose density gradient centrifugation after induction of the T3SS by  $\text{Ca}^{2+}$  depletion. Fractions were recovered, and samples were loaded on 15% SDS-PAGE gels and analyzed by Western blotting. Inner and outer membranes were identified through the presence of XcpY and OprF, selective markers for inner and outer membranes, respectively. ExsB was found to be co-localized with the secretin PscC to the outer membrane (Fig. 2), much like its *Yersinia* counterpart, YscW, which co-localizes with secretin YscC.<sup>16</sup>

#### The structure of ExsB reveals a novel fold

In order to gain further insight into ExsB functionality, we crystallized it and solved its high-resolution structure. In order to obtain soluble, crystallizable protein, we employed a construct lacking the signal peptide and the lipidation sequence. Our construct harbored two tags, namely, a hexa-histidine tag introduced between the signal peptide and a maltose-binding protein (MBP), located N-terminally to ExsB (17–141) and intercalated by a thrombin cleavage site (Fig. 3a). This construct was expressed in the *E. coli* periplasm and purified by Ni-chelating and cation-exchange (Mono S) chromatographies; tags were removed by thrombin cleavage prior to crystallization. Gel-filtration experiments performed on a Superdex 200 10/300 GL column revealed that ExsB eluted as

a monomer (not shown). ExsB (17–141) crystallized in space group C2 with three molecules in the asymmetric unit, and the structure was solved by performing a single anomalous dispersion (SAD) experiment on a selenomethionylated crystal at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) synchrotron in Grenoble. This initial experiment generated a 3-Å model, which was subsequently used to phase native data collected to 1.8 Å. Data collection, phasing and refinement statistics are included in Table 1.

The structure of ExsB is composed of seven  $\beta$ -strands and an  $\alpha$ -helical turn (Fig. 3b) and folds into a curved  $\beta$ -sandwich. The three smaller strands ( $\beta$ 1,  $\beta$ 4 and  $\beta$ 7) are packed against the four longer curved strands ( $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\beta$ 5 and  $\beta$ 6), forming a  $40 \text{ Å} \times 40 \text{ Å} \times 20 \text{ Å}$  structure. The region between the two  $\beta$ -sheets is decorated with side chains from both sheets, forming a tightly packed arrangement. Although the detergent dodecyl maltoside (DDM) was employed in the purification and was present as an additive in the final buffer at a concentration of 1 mM, it could not be visualized in the electron density map. Analysis of the structure of ExsB by the DALI server<sup>†</sup> identified strong structural similarities with specific domains of  $\beta$ -galactosidases; the significance of this similarity is unclear.

The structure also revealed the formation of a disulfide bridge between the well-conserved C-terminal cysteines (Cys125 and 129) (Figs. 1d and 3b and c). The role of this disulfide bond is unclear, since a stabilizing effect may be excluded due to the proximity of the two residues involved. Although their conservation in ExsB-like molecules from all Ysc-T3SS-related organisms (Fig. 1d) suggests that they could play a common role in a number of different species, *Yersinia* strains carrying YscW with

<sup>†</sup>[http://echidna.biocenter.helsinki.fi/dali\\_server/](http://echidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/)

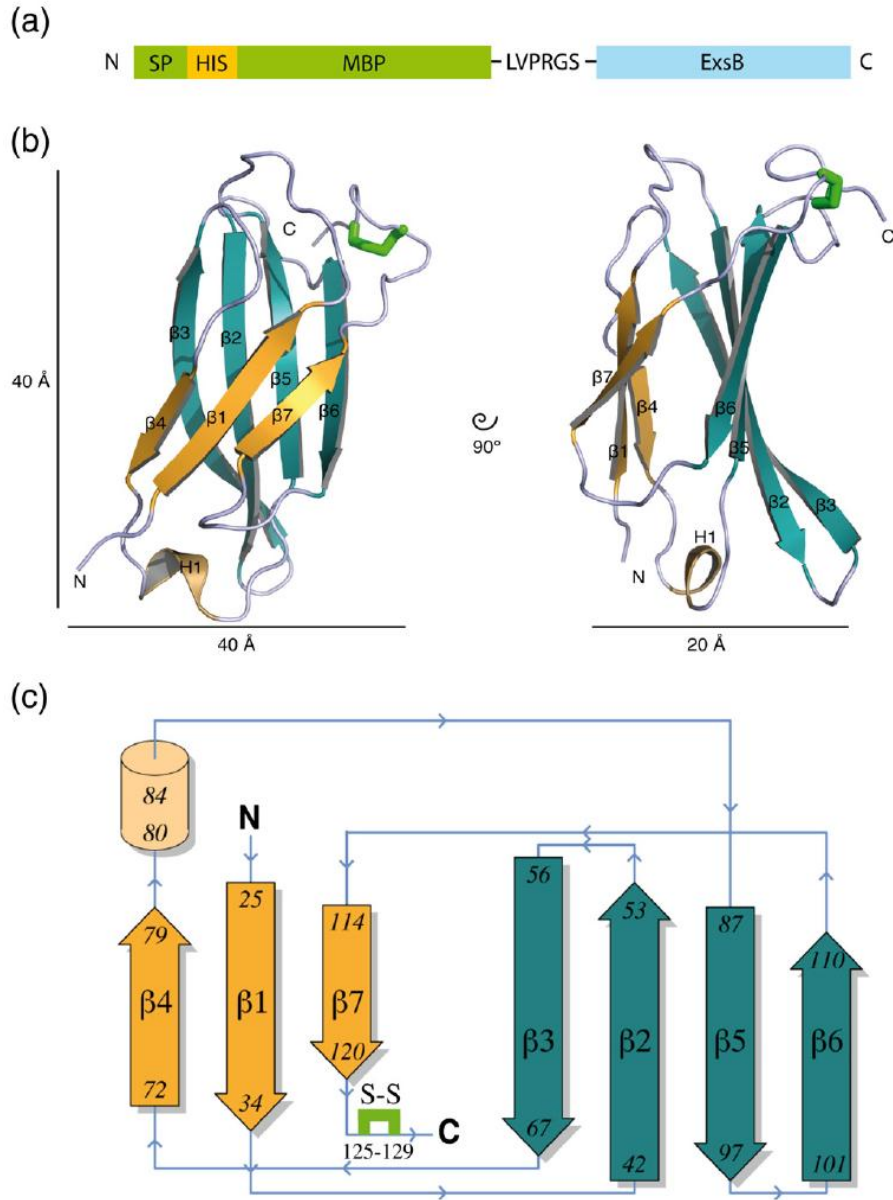


Fig. 3. Three-dimensional structure of ExsB. (a) Schematic diagram of the ExsB construct employed for X-ray crystallography studies in this work. SP is the periplasmic signal peptide, and LVPRGS is the thrombin cleavage sequence. (b) ExsB folds into a  $\beta$ -sandwich with a short  $\alpha$ -helix. The disulfide bridge is shown in light green. (c) The topology diagram of ExsB reveals that the  $\beta$ -sheets are interdependent (i.e., strands do not form independent sheets but are woven between both sheets).  $\beta$ -Strands forming the two  $\beta$ -sheets are shown in yellow and in green. The disulfide bridge is shown in light green.

the two C-terminal Cys residues mutated into serines did not display any T3SS-related phenotype.<sup>34</sup>

Two features of the ExsB structure are of particular interest. The first one is a positively charged residue patch, on the surface of the curved

$\beta$ -sheet, composed of four arginines that point out into the solvent (Arg46, Arg48, Arg64 and Arg91; Fig. 4a). This basic region could potentially mediate the interaction between ExsB and acidic lipids in the outer membrane, as it has been reported for other



Table 1. Data collection, phasing, molecular replacement and structure refinement statistics

Data set	Se-Met	Native
<i>Data collection</i>		
Wavelength (Å)	0.9792	0.9334
Space group	C2	C2
a (Å)	125.6	124.2
b (Å)	48.8	48.4
c (Å)	72.5	71.6
$\alpha = \gamma$ (°)	90.0	90.0
$\beta$ (°)	96.6	96.9
Resolution (Å)	3.0	1.8
No. of observed/unique reflections	94,664/16,999	110,486/35,870
Completeness (%)	98.9 (94.2)	89.9 (75.6)
$R_{\text{sym}}$ (last shell)	14.16 (37.8)	3.8 (39.5)
$I/\sigma(I)$ (last shell)	12.3 (5.1)	28.9 (3.0)
<i>Phasing</i>		
Phenix FOM (obs)	0.28	
<i>Molecular replacement</i>		
Phaser RFZ/TFZ		22.2/31.2
Phaser LLG		289/290
<i>Refinement</i>		
Resolution (Å)		1.81 (1.86)
(outer resolution shell)		
$R_{\text{work}}$ (%)		21.6 (40.6)
$R_{\text{free}}$ (%)		25.9 (43.4)
No. of protein atoms		2714
No. of solvent atoms		155
No. of nickel ions		1
No. of sulfate ions		4
RMSD, bond lengths (Å)		0.015
RMSD, bond angles (°)		1.786
Mean B-factor (Å <sup>2</sup> )		31.2
Residues in most favored/allowed region of Ramachandran plot (%)		100
Se-Met, selenomethionine.		

membrane-recognizing proteins such as Src, a tyrosine kinase implicated in signal transduction that employs a cluster of basic residues to enhance its recognition of lipid head groups on the plasma membrane<sup>39</sup> and the human immunodeficiency virus phosphoprotein Nef, which is essential for the modulation of signal transduction pathways upon human immunodeficiency virus infection and whose membrane recognition basic cluster is located at its N-terminus.<sup>40</sup> It is of interest that the latter authors demonstrated that mutations within the basic region of Nef greatly reduced membrane association, causing dramatic alterations in its subcellular distribution.

Secondly, ExsB harbors a small acidic patch, formed by residues Asp81, Glu84 and Glu86, located close to its N-terminal extremity (Fig. 4b); this region marks one edge of a cradle-shaped area identified with SURFNET, a program employed to generate molecular surfaces and predict potential protein binding sites.<sup>41</sup> The cradle identified in this manner is in fact an elongated region of 1100 Å<sup>3</sup> that

harbors a number of hydrophobic residues within the trough and is a potential binding site for other T3SS partner proteins.

Notably, the structure of ExsB is distinct from that of MxiM (Fig. 5), a key lipoprotein of the *Shigella* T3SS that has been shown to interact with the secretin MxiD.<sup>28</sup> Although both structures display stacked antiparallel  $\beta$ -sheets, ExsB lacks the elongated  $\alpha$ -helix present in MxiM, as well as the linear hydrophobic tunnel at its core, shown to bind lipids.<sup>26</sup> In addition, ExsB displays no structure similarity to any of the outer-membrane-associated lipoproteins (involved in either assembly of secretion systems or pilus macromolecular machineries) whose three-dimensional structures have been solved (Fig. 5). Although most of them have been implicated to different extents in assembly of the secretin, the main component of the OMR, it is of note that the structures show clear differences. In addition to being distinct from MxiM, the structure of ExsB is also different from that of PilP and PilW, both of which are involved in assembly of the PilQ secretin of the type IV pilus of *Neisseria meningitidis*, and PilF, which participates in the analogous process in *Pseudomonas*. The NMR structure of PilP displays a small  $\beta$ -stranded core and was found to resemble that of streptavidin.<sup>42</sup> PilW, on the other hand, in whose absence PilQ remains monomeric,<sup>43</sup> folds as a disulfide bridged tetratricopeptide repeat protein,<sup>44</sup> much like PilF.<sup>22,45</sup> Thus, even among proteins that have been clearly linked to assembly of outer membrane elements, structural differences do not allow for the generalization of their functions. These observations underline the importance of determining the role of each one of these proteins in secretion/pilus formation, as well as details of their interactions with their cognate protein partners, prior to generalization regarding their mechanisms of action.<sup>29</sup>

The localization of ExsB within an operon involved in transcriptional regulation is also of interest. The gene coding for ExsB is located immediately upstream of ExsA, an AraC/XylS-type regulator. Transcriptional activation and secretion are linked through a protein interaction cascade that involves not only ExsE and ExsC but also ExsD, which antagonizes the activity of ExsA by directly binding to it, forming a 1:1 complex that cannot bind DNA.<sup>36,38</sup> Despite its genetic localization, ExsB is yet to be shown to be involved in any type of transcriptional regulation loop, much like its *Yersinia* counterpart, YscW, whose gene is also located immediately upstream of a transcriptional regulator of the AraC/XylS family. Interestingly, a *P. aeruginosa* strain deleted of *exsB* displayed severely reduced production of the T3SS toxin ExoS, suggesting that it plays an important role in T3SS functionality.<sup>37</sup> It is thus conceivable that these proteins may display distinct mechanisms of action

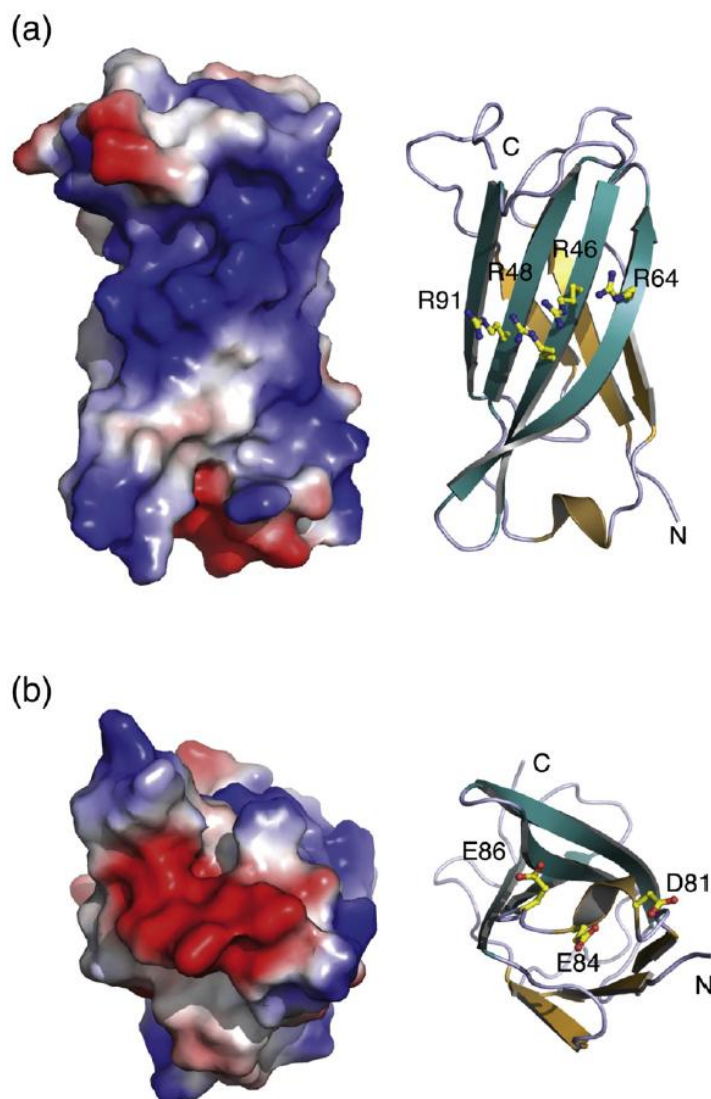


Fig. 4. Key charged regions in ExsB. (a) ExsB displays a highly basic region (represented in blue in the structure). This region is rich in arginine residues (Arg46, Arg48, Arg64 and Arg91). (b) View from the bottom of ExsB [in relation to (a)] showing the acidic region of ExsB: Asp81, Glu84 and Glu86 generate the negative charge of this region.

that are nonetheless crucial for the optimal functioning of a finely tuned T3SS.

## Materials and Methods

### Protein expression in *P. aeruginosa*

Clinical isolate CHA, a *P. aeruginosa* strain originally isolated from a cystic fibrosis patient,<sup>46</sup> was used for all experiments and was grown in LB medium at 37 °C with agitation at 300 rpm. The T3SS was induced by calcium depletion with 5 mM EGTA and 20 mM MgCl<sub>2</sub>. CaCl<sub>2</sub> (5 mM) was added in non-induced cultures in order to prevent basal T3SS protein expression. At an optical density

(OD<sub>600</sub>) of 1, the cells were pelleted by centrifugation at 5000g and 4 °C. For Western blotting, the supernatants were mixed with sample buffer, and for total cell protein analysis, cells were concentrated twice and subsequently boiled for 10 min in sample buffer.

### Membrane separation by sucrose gradient centrifugation

Inner and outer membranes were separated by centrifugation on sucrose gradients. Cell pellets from a 500-mL T3SS-induced *P. aeruginosa* culture were resuspended in 25 mL of buffer [20% sucrose (wt/wt) in 10 mM Tris-HCl at pH 7.4, 1 mM PMSF, 10 µg/mL RNase and 10 µg/mL DNase]. After cell



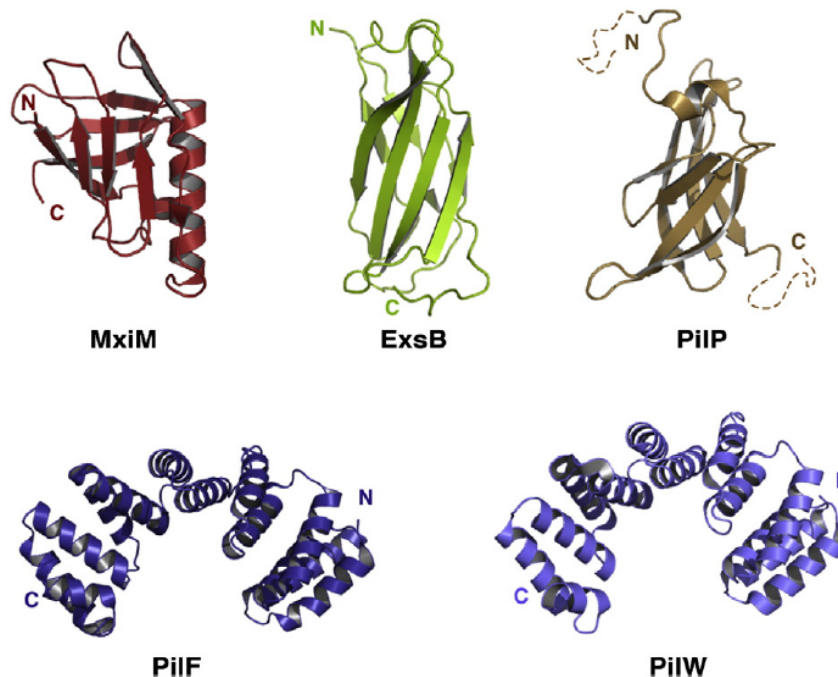


Fig. 5. Gallery of lipoproteins and pilotins. ExsB, MxiM and PilP display  $\beta$ -sandwich folds, with that of MxiM resembling the structure of lipocalins.<sup>26</sup> PilW and PilF, on the other hand, display an all-helical tetratricopeptide repeat fold. This gallery of structures reveals that lipoproteins involved in assembly of outer membrane structures possess very different folds. Protein Data Bank codes for the structures include 1Y9L (MxiM from *S. flexneri*), 2YJL (ExsB from *P. aeruginosa*), 2IVW (PilP from *N. meningitidis*), 2VQ2 (PilW from *N. meningitidis*) and 2HO1 (PilF from *P. aeruginosa*).

lysis with a M-110P Microfluidizer at 15,000 p.s.i. for 5 min, unbroken cells were removed by centrifugation, and total membranes were isolated by ultracentrifugation at 138,000g for 45 min. Inner and outer membranes were separated by a sucrose gradient as described by Viarre *et al.*<sup>31</sup> Briefly, total membranes were resuspended in a buffer containing 20% sucrose (wt/wt), 8 mM Tris-HCl at pH 7.4, 4 mM ethylenediaminetetraacetic acid and protease inhibitor cocktail complete (Roche) and loaded onto a 30–60% sucrose gradient in the same buffer. After 72 h of ultracentrifugation at 190,000g, 24 fractions of 500  $\mu$ L were collected and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. For the latter experiments, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes; after incubation with primary antibodies raised against ExsB (obtained from mice injected with the purified protein employed for X-ray crystallography; Agro-Bio), PopB,<sup>47</sup> PscC or XcpY, secondary horseradish-peroxidase-associated antibodies were added. Proteins were detected with a chemiluminescence kit (GE Healthcare).

#### Expression and purification of recombinant proteins

The region of the *P. aeruginosa* *exsB* gene from strain PAO1 coding for amino acids 17–141 was

amplified using conventional PCR methodologies and cloned into a modified pMal-p2x vector.<sup>44</sup> The resulting vector was transformed into *E. coli* Rosetta II cells (Invitrogen) to produce recombinant protein with an N-terminal hexa-histidine tag followed by an MBP. Protein expression was induced in LB medium with 1 mM IPTG at 37 °C for 3 h. Bacteria were pelleted by centrifugation, resuspended in a minimal volume of buffer [20 mM Hepes (pH 7.5), 200 mM NaCl, 20 mM imidazole and 1 mM DDM (Anatrace)] and lysed by sonication. The lysate was clarified by centrifugation and incubated with Ni-chelating resin (GE Healthcare) pre-equilibrated in lysis buffer. Protein elution was performed by an imidazole step gradient. Fractions containing ExsB were pooled and dialyzed for 2 h at 4 °C into 20 mM Hepes (pH 7.5), 200 mM NaCl and 20 mM imidazole and subsequently incubated with 1 unit of thrombin protease per milligram of MBP-ExsB. The protein was subsequently reincubated with the Ni Sepharose resin, and the eluted cleaved product was dialyzed for 2 h into 20 mM Hepes, pH 7.5, and 20 mM NaCl. ExsB was then loaded onto a 1-mL pre-packed cation-exchange column (Hitrap SP XL; GE Healthcare) pre-equilibrated in a low-salt-concentration buffer [20 mM Hepes (pH 7.5), 20 mM NaCl and 1 mM DDM]. Elution of the pure, concentrated protein was achieved by a step-

gradient elution with a high-salt-concentration buffer [20 mM Hepes (pH 7.5), 500 mM NaCl and 1 mM DDM]. ExsB was further concentrated to 5 mg/mL and used for crystallization tests.

Selenomethionylated ExsB was expressed in *E. coli* Rosetta II cells in M9 minimal medium supplemented with thiamine (200 mg/L), leucine (50 mg/L), valine (50 mg/L), isoleucine (50 mg/L), lysine (100 mg/L), phenylalanine (100 mg/L), threonine (100 mg/L) and selenomethionine (60 mg/L). Expression and purification were performed as for the native protein.

### Crystallization, data collection and structure solution

Crystals of both native and selenomethionylated ExsB were grown by the hanging-drop vapor diffusion method at 20 °C in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5), 1.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0–10% glycerol. Protein solution (1 µL) at 5 mg/mL was mixed with 1 µL of mother liquor, and the drop was sealed onto a 1-mL reservoir. Crystals were cryoprotected by brief soaking in mother liquor containing 20% glycerol and were subsequently flash-cooled in liquid nitrogen directly on the loop used for data collection. A SAD experiment was performed on the Se edge on beamline ID23-EH1 at the ESRF. The data set from the SAD experiment, collected to 3.0 Å, was processed and scaled with XDS,<sup>48</sup> revealing a C2 space group. Identification of selenium atom positions, refinement, phasing and automatic model building were performed with PHENIX.<sup>49</sup> Phaser<sup>50</sup> was subsequently used to perform molecular replacement using the model generated by the SAD experiment in order to phase a native data set (1.8 Å, space group C2) collected at the ESRF on beamline ID14-EH1. Cycles of manual building were performed using Coot<sup>51</sup> coupled with refinement cycles by REFMAC 5.5.<sup>52</sup>

### Accession numbers

Coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank with accession number 2YJL.

### Acknowledgements

The authors wish to thank the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) staff (Partnership for Structural Biology, PSB) for help with data collection, J. Marquez and the HTX Lab team (PSB) for access to and help with high-throughput crystallization, Carlos Contreras-Martel (Bacterial Pathogenesis Group, Institut de Biologie Structurale) for helpful suggestions on data collection and

structure refinement, Romé Voulhoux for anti-XcpY antibodies, Sophie de Bentzmann for anti-Dsb antibodies and Maria Guillermina Casabona (Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses Group, iRTSV) for help with membrane separation experiments. This work was supported by grants from the French Cystic Fibrosis Foundation (Vaincre la Mucoviscidose, to A.D. and I.A.) and the Direction des Sciences du Vivant, CEA. T.I. was supported by a Ph.D. fellowship from the Vaincre la Mucoviscidose, and C.P., by a fellowship from the IRTELIS-DSV program.

### References

- Lister, P. D., Wolter, D. J. & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 582–610.
- Izoré, T., Job, V. & Dessen, A. (2011). Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system. *Structure*, **19**, 603–612.
- Blocker, A. J., Deane, J. E., Veenendaal, A. K., Roversi, P., Hodgkinson, J. L., Johnson, S. & Lea, S. M. (2008). What's the point of the type III secretion system needle? *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105**, 6507–6513.
- Cornelis, G. R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nat. Rev., Microbiol.* **4**, 811–825.
- Marlovits, T. C. & Stebbins, C. E. (2009). Type III secretion systems shape up as they ship out. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 1–6.
- Matteï, P.-J., Faudry, E., Job, V., Izoré, T., Attree, I. & Dessen, A. (2011). Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *FEBS J.* **278**, 414–426.
- Galán, J. E. (2009). Common themes in the design and function of bacterial effectors. *Cell Host Microbe*, **5**, 571–579.
- Goure, J., Broz, P., Attree, O., Cornelis, G. R. & Attree, I. (2005). Protective anti-V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes. *J. Infect. Dis.* **192**, 218–225.
- Hauser, A. R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat. Rev., Microbiol.* **7**, 654–665.
- Worrall, L. J., Lameignere, E. & Strynadka, N. C. (2011). Structural overview of the bacterial injectisome. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 3–8.
- Deane, J. E., Abrusci, P., Johnson, S. & Lea, S. M. (2010). Timing is everything: the regulation of type III secretion. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 1065–1075.
- Hodgkinson, J. L., Horsley, A., Stabat, D., Simon, M., Johnson, S., da Fonseca, P. C. A. *et al.* (2009). Three-dimensional reconstruction of the *Shigella* T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **5**, 477–485.
- Reichow, S. L., Korotkov, K. V., Hol, W. G. J. & Gonen, T. (2010). Structure of the cholera toxin secretion channel in its closed state. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1226–1233.



14. Schraidt, O., Lefebvre, M. D., Brunner, M. J., Schmied, W. H., Schmidt, A., Radics, J. *et al.* (2010). Topology and organization of the *Salmonella typhimurium* type III secretion needle complex components. *PLoS Pathog.* **6**, e1000824.
15. Spreter, T., Yip, C. K., Sanowar, S., Andre, I., Kimbrough, T. G., Vuckovic, M. *et al.* (2009). A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **5**, 468–476.
16. Burghout, P., Beckers, F., de Wit, E., van Boxel, R., Cornelis, G. R., Tommassen, J. & Koster, M. (2004). Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* **186**, 5366–5375.
17. Crago, A. M. & Koronakis, V. (1998). *Salmonella* InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization. *Mol. Microbiol.* **30**, 47–56.
18. Daefler, S. & Russel, M. (1998). The *Salmonella typhimurium* InvH protein is an outer membrane lipoprotein required for the proper localization of InvG. *Mol. Microbiol.* **28**, 1367–1380.
19. Nakano, N., Kubori, T., Knoshita, M., Imada, K. & Nagai, H. (2010). Crystal structure of *Legionella* DotD: insights into the relationship between type IVb and type II/III secretion systems. *PloS Pathog.* **6**, e1001129.
20. Balasingham, S. V., Collins, R. F., Assalkhou, R., Homberset, H., Frye, S. A., Derrick, J. P. & Tonjum, T. (2007). Interactions between the lipoprotein PilP and the secretin PilQ in *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* **189**, 5716–5727.
21. Jain, S., Mosicka, K. B., Bos, M. P., Pachulec, E., Stuart, M. C. A., Keegstra, W. *et al.* (2011). Structural characterization of outer membrane components of the type IV pili system in pathogenic *Neisseria*. *PloS ONE*. **6**, e16624.
22. Koo, J., Tammam, S., Ku, S.-Y., Sampaleanu, L. M., Burrows, L. L. & Howell, P. L. (2008). PilF is an outer membrane lipoprotein required for multimerization and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus secretin. *J. Bacteriol.* **190**, 6961–6969.
23. Guilvout, I., Chami, M., Engel, A., Pugsley, A. P. & Bayan, N. (2006). Bacterial outer membrane secretin PilD assembles and inserts into the inner membrane in the absence of its pilotin. *EMBO J.* **25**, 5241–5249.
24. Hardie, K. R., Lory, S. & Pugsley, A. P. (1996). Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein. *EMBO J.* **15**, 978–988.
25. Hardie, K. R., Seydel, A., Guilvout, I. & Pugsley, A. P. (1996). The secretin-specific chaperone-like protein of the general secretory pathway: separation of proteolytic protection and piloting functions. *Mol. Microbiol.* **5**, 967–976.
26. Lario, P. I., Pfuetzner, R. A., Frey, E. A., Creagh, L., Haynes, C., Maurelli, A. T. & Strynadka, N. C. (2005). Structure and biochemical analysis of a secretin pilot protein. *EMBO J.* **24**, 1111–1121.
27. Okon, M., Moraes, T. F., Lario, P. I., Creagh, A. L., Haynes, C. A., Strynadka, N. C. & McIntosh, L. P. (2008). Structural characterization of the type III pilot-secretin complex from *Shigella flexneri*. *Structure*, **16**, 1544–1554.
28. Schuch, R. & Maurelli, A. T. (2001). MxiM and MxiJ, base elements of the Mxi-Spa type III secretion system of *Shigella*, interact with and stabilize the MxiD secretin in the cell envelope. *J. Bacteriol.* **183**, 6991–6998.
29. Bayan, N., Guilvout, I. & Pugsley, A. P. (2006). Secretins take shape. *Mol. Microbiol.* **60**, 1–4.
30. Remans, K., Vercammen, K., Bodilis, J. & Cornelis, P. (2010). Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **156**, 2597–2607.
31. Viarre, V., Cascales, E., Ball, G., Michel, G. P., Filloux, A. & Voulhoux, R. (2009). HxcQ lipoprotein is self-piloted to the outer membrane by its N-terminal lipid anchor. *J. Biol. Chem.* **284**, 33815–33823.
32. Troisfontaines, P. & Cornelis, G. R. (2005). Type III secretion: more systems than you think. *Physiology*, **20**, 326–339.
33. Juncker, A. S., Willenbrock, H., Von Heijne, G., Brunak, S., Nielsen, H. & Krogh, A. (2003). Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci.* **12**, 1652–1662.
34. Allaoui, A., Scheen, R., Rouvroit, C. L. & Cornelis, G. R. (1995). VirG, a *Yersinia enterocolitica* lipoprotein involved in  $Ca^{2+}$  dependency, is related to ExsB of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **177**, 4230–4237.
35. Brutinel, E. D., Vakulskas, C. A. & Yahr, T. L. (2010). ExsD inhibits expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by disrupting ExsA self-association and DNA binding activity. *J. Bacteriol.* **192**, 1479–1486.
36. Thibault, J., Faudry, E., Ebel, C., Attree, I. & Elsen, S. (2009). Anti-activator ExsD forms a 1:1 complex with ExsA to inhibit transcription of type III secretion operons. *J. Biol. Chem.* **284**, 15762–15770.
37. Goranson, J., Hovey, A. K. & Franck, D. W. (1997). Functional analysis of *exsC* and *exsB* in regulation of exoenzyme S production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **179**, 1646–1654.
38. Dasgupta, N., Ashare, A., Hunninghake, G. W. & Yahr, T. L. (2006). Transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by low  $Ca^{2+}$  and host cell contact proceeds through two distinct signaling pathways. *Infect. Immun.* **74**, 3334–3341.
39. Sigal, C. T., Zhou, W., Buser, C. A., McLaughlin, S. & Resh, M. D. (1994). Amino-terminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 12253–12257.
40. Bentham, M., Mazaleyra, S. & Harris, M. (2006). Role of myristoylation and N-terminal basic residues in membrane association of the human immunodeficiency virus type 1 Nef protein. *J. Gen. Virol.* **87**, 563–571.
41. Laskowski, R. A. (1995). SURFNET: a program for visualizing molecular surfaces, cavities, and intermolecular interactions. *J. Mol. Graphics*, **13**, 323–330.
42. Golovanov, A. P., Balasingham, S., Tzitzilonis, C., Goult, B. T., Lian, L.-Y., Homberset, H. *et al.* (2006). The solution structure of a domain from the *Neisseria meningitidis* lipoprotein PilP reveals a new  $\Delta$ -sandwich fold. *J. Mol. Biol.* **364**, 186–195.
43. Carbonnelle, E., Helaine, S., Prouvensier, L., Nassif, X. & Pelicic, V. (2005). Type IV pilus biogenesis in

- Neisseria meningitidis*: PilW is involved in a step occurring after pilus assembly, essential for fibre stability and function. *Mol. Microbiol.* **55**, 54–64.
44. Trindade, M. B., Job, V., Contreras-Martel, C., Pelicic, V. & Dessen, A. (2008). Structure of a widely conserved type IV pilus biogenesis factor which affects the stability of secretin multimers. *J. Mol. Biol.* **378**, 1031–1039.
  45. Kim, K., Oh, J., Han, D., Kim, E. E., Lee, B. C. & Kim, Y. (2006). Crystal structure of PilF: functional implication in the type 4 pilus biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 1028–1038.
  46. Dacheux, D., Attree, I., Schneider, C. & Toussaint, B. (1999). Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. *Infect. Immun.* **67**, 6164–6167.
  47. Goure, J., Pastor, A., Faudry, E., Chabert, J., Dessen, A. & Attree, I. (2004). The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infect. Immun.* **72**, 4741–4750.
  48. Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132.
  49. Adams, P. D., Afonine, P. V., Bukoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N. *et al.* (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221.
  50. Storoni, L., McCoy, A. & Read, R. (2004). Likelihood-enhanced fast rotation functions. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **57**, 1373–1382.
  51. Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132.
  52. Murshudov, G., Vagin, A. & Dodson, E. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **53**, 240–255.

#### ***Annexe 4 : Article en cours de rédaction sur l'étude du rôle de ExsB chez P. aeruginosa***

**« ExsB protein is involved in *Pseudomonas aeruginosa* virulence and has a pilotin function for the T3SS PscC secretin »**

##### Résumé de l'article :

La bactérie pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* possède un Système de Sécrétion de Type III (SST3) lui permettant d'injecter des toxines directement dans le cytoplasme de cellules eucaryotes cibles. L'un des composants de ce système est la lipoprotéine ExsB, localisée dans la membrane externe de la bactérie. Ce travail consiste à étudier le rôle de cette protéine, jusqu'alors inconnu. ExsB pourrait être impliquée dans la régulation car son gène est situé dans l'opéron de régulation du SST3, ou bien être un pilotine comme son homologue YscW chez *Yersinia spp.* Nous montrons ici que ExsB est requise pour la virulence complète de *P. aeruginosa in vivo*. Nous démontrons également que ExsB est nécessaire pour une activité optimale du SST3 à la fois *in vitro* et dans des modèles d'infection de cellules eucaryotes. Enfin, nous montrons que ExsB a un rôle dans l'assemblage de l'anneau de sécrétine PscC du SST3, révélant le rôle moléculaire de ExsB en tant que pilotine.

##### Contribution à cet article :

Ma contribution a été d'étudier le rôle de la protéine ExsB *in vitro* et dans des modèles d'infection de cellules eucaryotes, et de rechercher son action de pilotine par son implication dans l'assemblage de la sécrétine PscC. J'ai donc effectué toutes les manipulations, avec la collaboration de mes collègues, à l'exception des infections de souris et d'HUVEC. J'ai également participé à la rédaction de l'article.

# ExsB protein is involved in *Pseudomonas aeruginosa* virulence and has a pilotin function for the T3SS PscC secretin

Caroline Perdu<sup>1</sup>, Philippe Huber<sup>1</sup>, Stéphanie Bouillot<sup>1</sup>, Ariel J. Blocker<sup>2</sup>, Sylvie Elsen<sup>1</sup>, Ina Attrée<sup>1</sup>, Eric Faudry<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses Group, iRTSV ; Université Grenoble I ; Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) ; Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), ERL5261 ; INSERM U1036\_S ; Grenoble ; France

<sup>2</sup> Schools of Cellular & Molecular Medicine and Biochemistry, University of Bristol, Bristol, United Kingdom

Corresponding author: [eric.faudry@cea.fr](mailto:eric.faudry@cea.fr)

## **ABSTRACT**

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen responsible for high morbidity infections of cystic fibrosis patients and nosocomial infections. Among its numerous virulence factors, a Type III Secretion System (T3SS) injects toxins directly into the host cell cytoplasm. ExsB, a small lipoprotein localized in the bacterium outer membrane, is one component of this machinery whose function remained unknown. The localization of its gene suggested a role in the T3SS regulation while its similarity with YscW from *Yersinia spp* was in favor of a pilotin role. The present work shows that ExsB is necessary for *P. aeruginosa* complete virulence *in vivo*. Furthermore, the requirement of ExsB for optimal T3SS activity is demonstrated both by *in vitro* assays and models of eukaryotic cell infection. It is also established that ExsB has a role in the assembly of the outer membrane secretin ring, highlighting the molecular role of ExsB as a pilotin.

**Keywords:** Type III Secretion, virulence, infection, *Pseudomonas aeruginosa*, pilotin, secretin,

## **INTRODUCTION**

*Pseudomonas aeruginosa* is a gram negative bacterium that lives in a variety of environments (Green et al. 1974 ; Remold et al. 2011) and colonizes diverse hosts, from invertebrates to humans (Young 1977 ; Fotedar et al. 1989 ). It is nowadays a real health problem, being the third most frequent hospital-acquired bacteria behind *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in France (Thiolet 2007).

Moreover, it is the first cause of mortality and morbidity for people suffering from cystic fibrosis (Govan et al. 1996). As a result, it is imperative to find new ways to fight against this bacterium, especially as multiple antibiotic resistances are appearing (Strateva et al. 2009 ; de Bentzmann et al. 2011). In this perspective, a better understanding of the virulence mechanisms of the bacteria is a strategy to identify new therapeutical targets and to eventually develop new and specific drugs.



One major virulence factor of *P. aeruginosa* is the Type III Secretion System (T3SS). This system is well conserved among bacterial pathogens, such as *Yersinia pestis*, the causative agent of plague and *Salmonella* species or *Shigella flexneri*, responsible for intestinal diseases (Coburn et al. 2007). It has been shown that the T3SS of *P. aeruginosa* is particularly active during acute infections and is associated with poor clinical outcomes (Hauser et al. 2002). Indeed, the presence of an active T3SS is correlated with an increased mortality (Roy-Burman et al. 2001).

The T3SS allows the bacterium to inject toxins directly into the host cell cytoplasm in order to hijack key cellular functions, leading to disruption of actin cytoskeleton and to cell death. This injection machinery consists of more than twenty proteins, assembled in a syringe-like structure and composed by three complexes: the basal body, the needle and the translocon (Blocker et al. 1999). In the cytoplasm, a proteic ring makes the connection between the basal body and other soluble proteins. The basal body spans the two bacterial membranes and is made of three major proteins: PscD and PscJ in the inner membrane, and the secretin PscC in the outer membrane. Each of these components oligomerizes into rings of 12-24 subunits. The needle is anchored to the basal body and forms a 80 nm long narrow channel that protrudes from the bacterial surface. It is assembled by polymerization of the small protein PscF. Finally, the translocon, made of the tip protein PcrV and the pore proteins PopB and PopD, forms a pore at the extremity of the needle, into the eukaryotic membrane.

The presence of the secretin ring in the outer membrane is essential for the T3SS activity. Proteins belonging to the secretin family are found in several transport systems, such as the Type II Secretion System or the Type IV pili. They assemble in two stacked oligomeric rings

of 12-14 subunits, with a central pore of 5 nm, that were observed by electron microscopy (Koster et al. 1997 ; Burghout et al. 2004). The Type III secretin oligomers are very stable, heat and SDS-resistant, and have a high molecular weight of about 985 kDa in *Y. enterocolitica* (Burghout et al. 2004). The N-terminal domains of secretins present low similarity and should have a role in specific interactions in each system. On the opposite, the C-terminal domains are largely conserved and are thought to be involved in the oligomerization and pore formation. However, a small non-conserved stretch at their C-terminal extremity was found, in some studies, to interact with small lipoproteins, called pilotins (Lario et al. 2005 ; Gu et al. 2012). Indeed, the secretins often require other proteins, in particular pilotins, for a correct assembly in the outer membrane (Koo et al. 2012).

Pilotins share few structural similarities but possess some common features: they usually are small lipoproteins with a high isoelectric point (Remans et al. 2010). The characterization of some pilotins from different secretion systems showed that they are involved in the stability, localization and/or oligomerization of secretins. For instance, the well studied pilotins OutS from the T2SS of *Erwinia Chrysanthemi* and PilW from the Type IV pili of *Neisseria species* were shown to be involved in the assembly and/or stability of the oligomers of OutD and PilQ secretins, respectively, but not in their localization (Szeto et al.; Shevchik et al. 1998 ; Carbonnelle et al. 2005 ). Some T3SS pilotins were also characterized. The case of *S. flexneri* is controversial as two lipoproteins participate in secretin oligomerization and stabilization (Schuch et al. 2001 ; Derrick 2008; Okon et al. 2008 ). In *S. typhimurium* and *Y. enterocolitica*, the deletions of the lipoproteins InvH and YscW, respectively, lead to a decreased quantity of secretin oligomers InvG and YscC, respectively,

and a mislocalization in the inner membrane instead of the outer membrane (Crago et al. 1998 ; Burghout et al. 2004). Moreover, a phenotypic analysis of *Yersinia* and *Salmonella* strains lacking the YscW or InvH pilotin revealed a drastic decrease in protein secretion as well as in apoptosis of infected cells (Allaoui et al. 1995 ; Lodge et al. 1995 ; Watson et al. 1995 ; Bi et al. 2009 ; Pati et al. 2013).

The ExsB protein from *Pseudomonas aeruginosa* displays 26.2% of sequence similarity with the YscW pilotin and is also predicted to be a lipoprotein with a low molecular weight of 15.6kDa and a high isoelectric point of 9.43 (Allaoui et al. 1995). The structure of this protein was recently characterized and revealed a new fold, being composed of seven  $\beta$ -strands and an  $\alpha$ -helix and also presenting two charged zones that could be involved in the interaction with lipids and other proteins (Izore et al. 2011). While the protein is localized in the bacterial outer membrane, the role of ExsB in *P. aeruginosa* is not known. It could be a pilotin, as suggested for its counterpart in *Yersinia* and from its general characteristics. On the other hand, ExsB could participate in a regulatory pathway. Indeed, its gene is localized in the T3SS regulation operon, just upstream from the main transcriptional activator of the system.

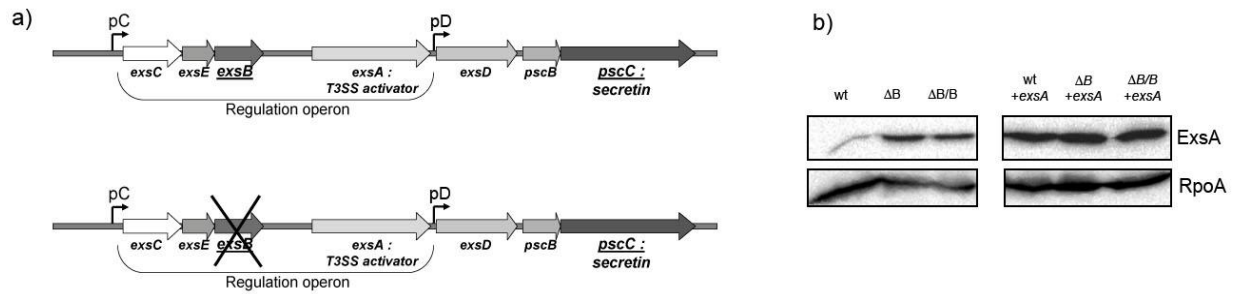
The aim of this study is to get insights into the role of ExsB in *P. aeruginosa*. In that perspective, a comparative study of the phenotypes of a mutant strain lacking *exsB* gene, the corresponding complemented strain and the wild type strain was carried out. *In vivo* and *in vitro* analysis showed the requirement of ExsB for complete virulence of *P. aeruginosa* and for optimal T3SS activity. Moreover, the investigation

of the molecular role of ExsB revealed its involvement in the assembly of the secretin of this system.

## **RESULTS**

### **Effects of ExsB deletion on the regulation operon**

A strain lacking *exsB* gene ( $\Delta exsB$ ) and a strain harbouring its chromosomal complementation ( $\Delta exsB/exsB$ ) were constructed in order to study the molecular role of ExsB in T3SS activity. The complementation was carried out by inserting in the chromosome a copy of the gene under the control of its original pC promoter, because the use of a plasmid for complementation lead to a strong overexpression of ExsB and to important growth defects. Noteworthy, *exsB* gene is located in the regulation operon, just upstream from the gene of ExsA, the main T3SS activator (Fig. 1a). Thus, the effect of *exsB* deletion on the level of *exsA* expression was assessed by detecting ExsA in the bacteria extracts by western blot. An overexpression of this protein is observed both in the mutant and complemented strains (Fig. 1b, left panel). This means that the deletion of *exsB* generates a polar effect on *exsA* expression. We considered that the overexpression of ExsA could mask phenotypic differences between the wild type and the mutant strains. For that reason, a plasmid was used to moderately overexpress ExsA, in order to restore similar levels of expression of this T3SS activator in all the strains (Fig. 1b, right panel). This allowed a more accurate study of the phenotype due to *exsB* deletion.

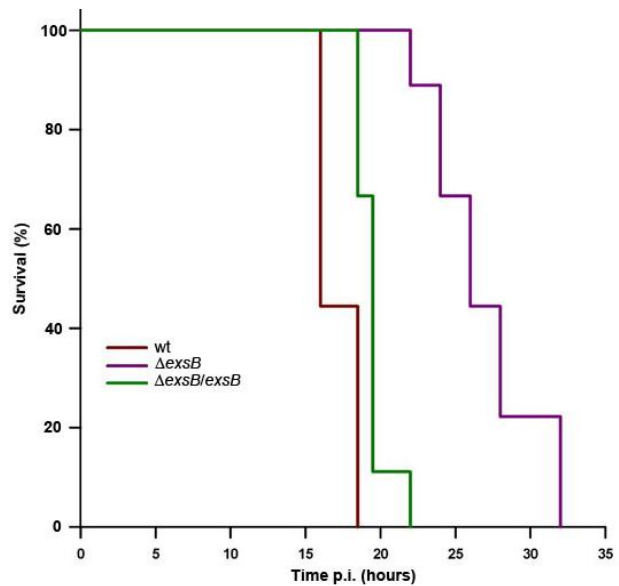


**Figure 1: *exsB* deletion has a polar effect on the T3SS regulation operon**

- a) Genetic organization of T3SS regulation operon and downstream genes in the wild type strain (at the top) and in the mutant strain lacking *exsB* gene (at the bottom)
- b) Expression of the T3SS transcriptional activator ExsA revealed by western blot in the different strains : wild type (wt) ; mutant lacking *exsB* ( $\Delta exsB$ ) ; complemented ( $\Delta exsB/exsB$ ) ; wild type, mutant lacking *exsB* and complemented strains overexpressing the ExsA (wt+*exsA*,  $\Delta exsB$ +*exsA*,  $\Delta exsB/exsB$ +*exsA*). RpoA is the cytoplasmic RNA polymerase A that is used as a loading control.

### Deletion of *exsB* reduces *P. aeruginosa* virulence during mice infection

For *in vivo* studies, mice were infected by inhalation of the different *P. aeruginosa* strains to induce acute pneumonia. The analysis of the survival curves shows a delayed death for mice infected by *P. aeruginosa* lacking *exsB* (Fig. 2). Indeed, the mean survival times for animals infected by wild type or complemented strains are 17.1 and 19.4 hours, respectively, while this time increases to 26.9 hours for mice infected by the mutant strain lacking *exsB*. This difference is statistically significant (p-value < 0.01 with the LogRank test). Therefore, this *in vivo* experiment shows that ExsB has a significant role in *P. aeruginosa* virulence during acute infection.



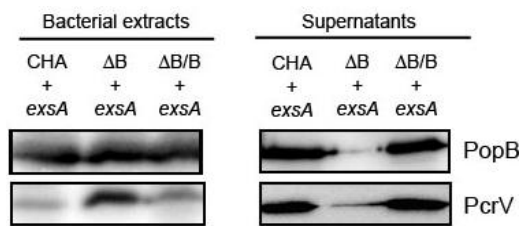
**Figure 2: Effects of *exsB* deletion in virulence during mice pneumonia model**

Survival curves of mice infected by wild type (wt), mutant lacking *exsB* ( $\Delta exsB$ ) and complemented ( $\Delta exsB/exsB$ ) strains of *P. aeruginosa*. Mice were infected with  $2 \times 10^6$  bacteria and survival monitored every two hours.

### *in vitro* secretion of T3SS proteins decreases in the absence of *exsB*

Given its genetic localization in the T3SS locus, ExsB could be involved in T3SS activity. This would explain the observations made in mice infections. Therefore, T3SS activity was checked *in vitro* by analyzing the expression and secretion of two T3SS substrates, PopB and PcrV, by immunoblotting. Lower amounts of these proteins were found in the supernatant of the mutant strain lacking *exsB* while these proteins accumulated

inside the bacteria cytoplasm (Fig. 3). In this experiment, *exsA* was moderately plasmid-overexpressed in order to restore identical T3SS activation in all strains (see above). In the absence of *exsA* plasmid, the reduction of secretion by  $\Delta exsB$  strain is also observed but the complemented strain  $\Delta exsB/exsB$  exhibits higher secretion than the wt strain, due to the overexpression of *exsA* in this strain (data not shown). In conclusion, the absence of *exsB* did not lead to a defective protein biosynthesis but only to a decreased secretion *in vitro*.



**Figure 3: T3SS activity *in vitro* is impaired in the absence of ExsB**

*In vitro* expression and secretion of two T3SS proteins: PopB and PcrV, visualized by western blot. The strains assessed are the wild type, mutant lacking *exsB* and complemented strains. All these strains moderately overexpress the T3SS activator ExsA to the same level.

### **ExsB is required for T3SS optimal activity towards eukaryotic cells**

In order to assess the role of ExsB in T3SS activity towards eukaryotic cells, a cytotoxicity assay on Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) was employed. Indeed, the use of a primary culture of HUVEC is appropriate as it mimics real conditions of infection. This assay relies on the disruption of actin cytoskeleton by T3SS toxins, leading to cellular retraction. The decrease in cellular surface is therefore the indicator of cytotoxicity. In this experiment, the cytotoxicity caused by the mutant strain  $\Delta exsB$  was about 40% lower than those caused by the wild type and complemented strains (Fig. 4a).

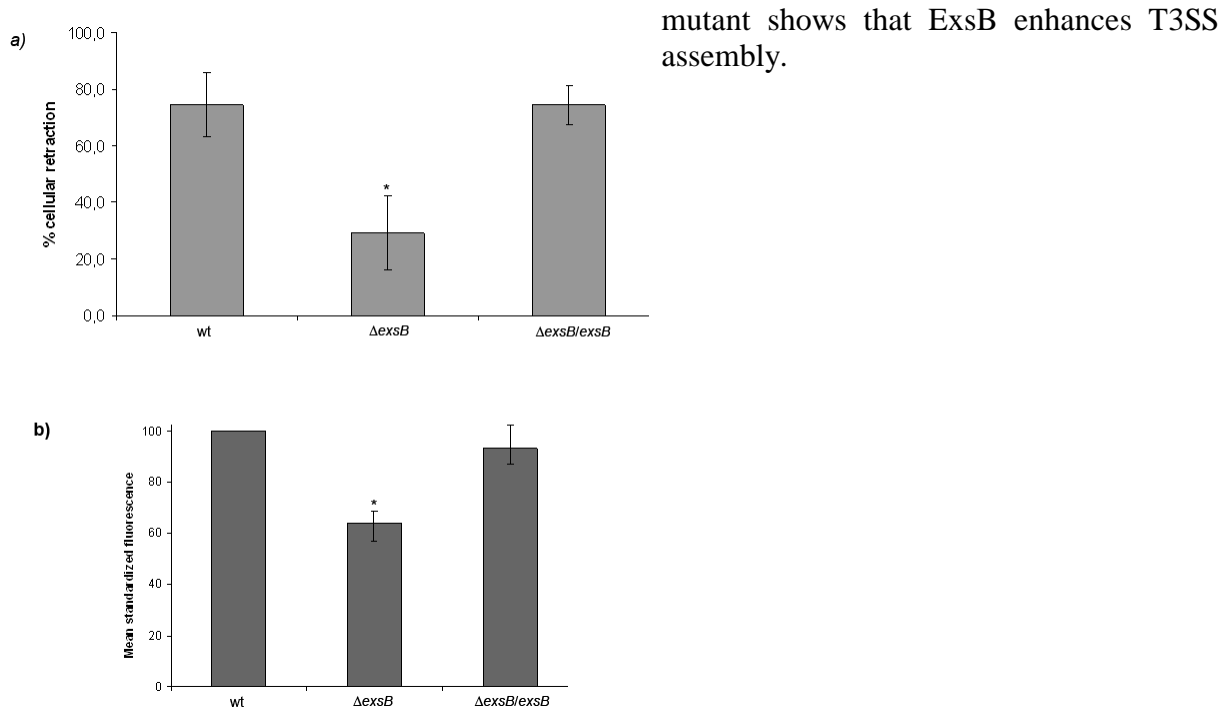
A cytotoxicity assay on J774 mice macrophages confirmed these results. The measurement of intracellular Lactate Dehydrogenase (LDH) release by infected cells, known to be correlated to T3SS activity, showed a low decrease in

the cytotoxicity caused by the mutant  $\Delta exsB$ , in comparison with the wild type and complemented strains. As this assay is very sensitive, the effect of *exsB* deletion was more visible for the strains overexpressing *exsA* (supplementary figure 1).

As the decrease in cytotoxicity observed in the absence of *exsB* suggests a decrease in the amount of effectors translocated into the host cell cytoplasm, the injection of a chimeric toxin, ExoS- $\beta$ -lactamase, was assessed in the presence or absence of ExsB. In this assay a fluorescent reporter molecule (CCF2) emits a green fluorescence in the cells when no chimeric toxin is injected. Upon injection, cleavage of the fluorescent probe by the  $\beta$ -lactamase results in blue fluorescence of the cells (Verove et al. 2012).

Analysis of cell fluorescence showed a decrease in the mean blue fluorescence of BJAB cells infected by the mutant strain lacking *exsB*, in comparison with the wild type and complemented strains (Fig. 4b). This observation indicated that there is a decrease of injection of the chimeric toxin when *exsB* is deleted. This result was confirmed by the infection of another cell line, A549 cells, by the same strains (data not shown).

This diminution of toxin injection in the absence of ExsB is not due to an uncontrolled secretion and a leakage in the extracellular medium. Indeed, after infection of eukaryote cells by the different strains producing the chimeric toxin ExoS- $\beta$ -lactamase, nearly no  $\beta$ -lactamase activity could be detected in the extracellular medium (data not shown). This means that the injection is polarized for all the strains, expressing or not ExsB.



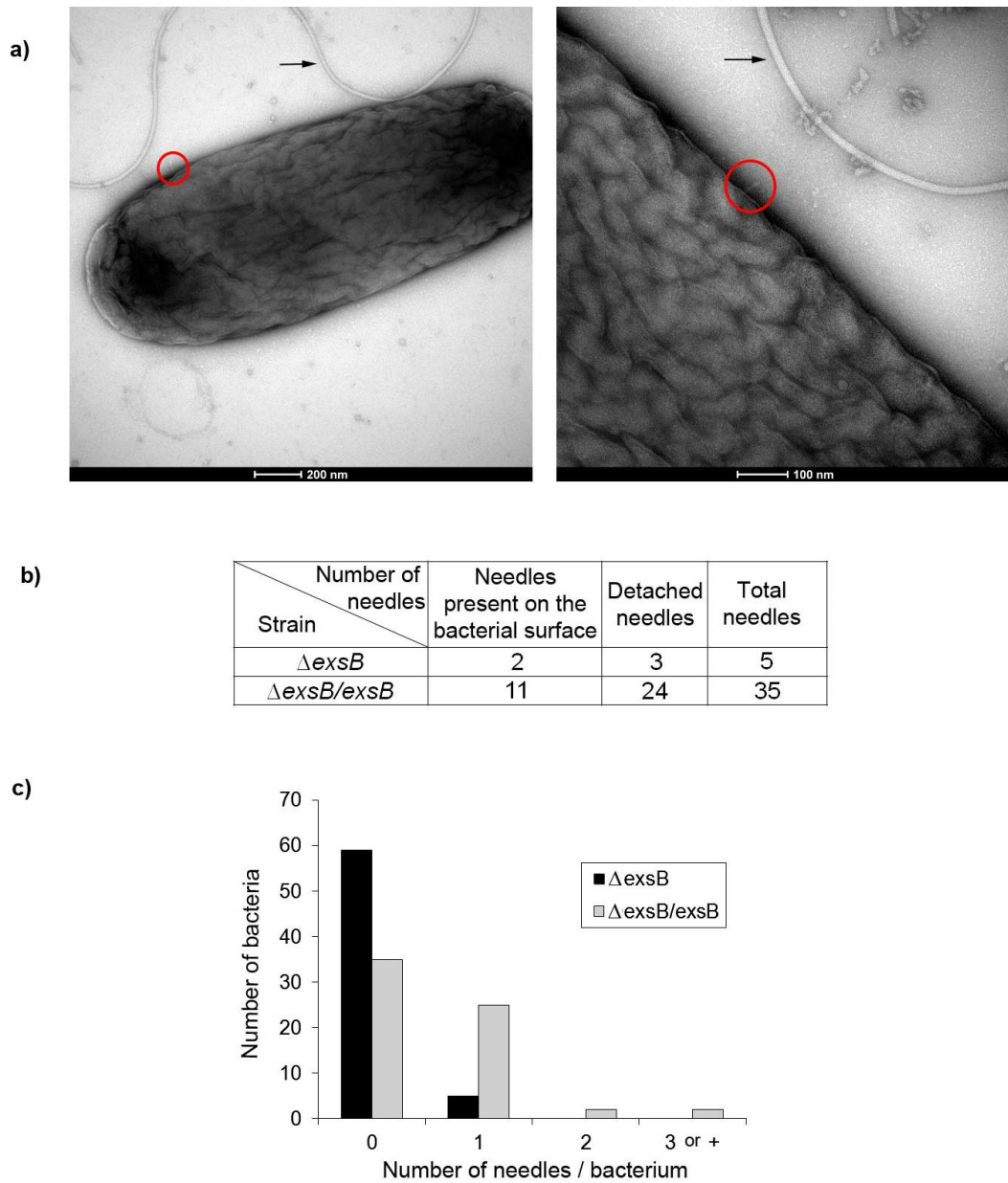
**Figure 4: *exsB* deletion reduces T3SS activity towards eukaryotic hosts**

- a) Cytotoxicity assay on Human Umbilical Vein Endothelial Cells. The percentage of cellular retraction was measured after 3 hours of infection by the wild type (wt), mutant ( $\Delta exsB$ ) and complemented ( $\Delta exsB/exsB$ ) strains
- b) Injection of the chimeric toxin ExoS- $\beta$ -lactamase into the host cell cytoplasm, revealed by the fluorescence of the CCF2 fluorescent probe

Taken together, these experiments revealed that *exsB* gene deletion leads to a decrease in the secretion of T3SS substrates but not in a default of translocation. This decrease could be explained by an incorrect assembly of the T3SS.

### **The number of T3SS needles decreases in the absence of ExsB**

To assess the assembly of the T3SS in the bacteria, transmission electron microscopy pictures of individual bacteria from each strain,  $\Delta exsB$  and  $\Delta exsB/exsB$ , were taken to count T3SS needles (Fig. 5a). Analysis of 60 pictures for each strain revealed that in the absence of ExsB, a significant decrease in the number of T3SS needles was observed, both at the bacterial surface and in the extracellular medium (Fig. 5b and c). It is known that manipulation of concentrated bacteria suspensions results in breakage and detachment of surface exposed T3SS (Pastor et al. 2005). The diminution of T3SS needles in the *exsB*

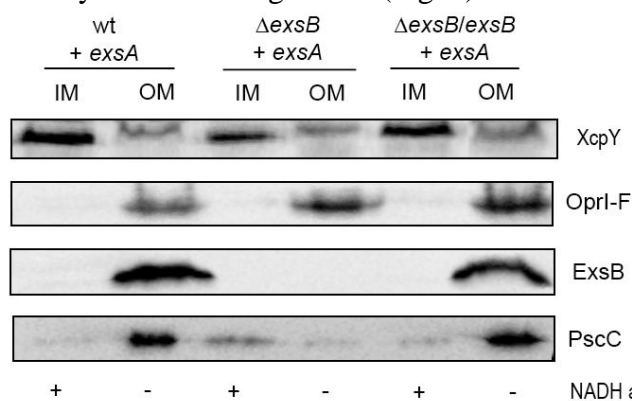


**Figure 5 : Involvement of ExsB in T3SS needle assembly**

- a) Pictures of *P. aeruginosa* bacteria exhibiting a T3SS needle observed by transmission electronic microscopy (TEM) with negative staining. The needles are indicated by a red circle and the flagellum is pointed by a black arrow.
- b) Number of T3SS needles counted for each *P. aeruginosa* strain
- c) Number of bacteria possessing 0, 1, 2 or >3 T3SS needles both at their surface and in their close extracellular environment.

### ExsB participates in the oligomerization and outer membrane targeting of the secretin PscC

ExsB could be a pilotin for the PscC secretin, as suggested for its homolog in *Y. enterocolitica*. In this case, it should participate to the stability, localization and oligomerization of the secretin. No effect of *exsB* deletion was observed on PscC stability (data not shown). However, the localization of the secretin oligomers in strains expressing or not *exsB* were studied by analyzing the inner and outer membranes separated according to their density on a sucrose gradient (Fig. 6).



**Figure 6: *exsB* deletion leads to a reduction of the T3SS secretin PscC in the outer membrane**

Inner and outer membranes of wild type (wt), mutant lacking *exsB* ( $\Delta exsB$ ) and complemented ( $\Delta exsB/exsB$ ) strains overexpressing the activator *exsA* were separated according to their density, on a sucrose gradient. The separated fractions were analyzed by immunoblot. Marker proteins identify inner and outer membrane fractions. The XcpY protein is an inner membrane component of the T2SS, and the OprI-F porins are outer membrane proteins. Moreover, NADH activity is a marker of inner membranes.

The amount of the PscC secretin in the mutant strain was notably lower than in the wild type and complemented strains. Moreover, the secretin mainly mislocalized in the inner membrane. These results show that ExsB participates in the assembly/targeting of secretin oligomers into the outer membrane, showing that ExsB plays a pilotin role for the secretin PscC.

## DISCUSSION

In this study, a variety of assays ranging from animal model of infection to molecular microbiology, highlights the role of ExsB in T3SS assembly and as a consequence in the T3SS-dependent virulence.

Deletion of *exsB* resulted in a disturbance of the regulation operon and an overexpression of the T3SS activator ExsA, in both mutant and complemented strains. This polar effect is probably due to an increase in the stability of the mRNA of the entire regulation operon. In some experiments, the phenotypic difference between the wild type and mutant strain lacking *exsB* was very small because ExsA overexpression masked the T3SS defect induced by *exsB* deletion. In those cases, the observation was confirmed by using a plasmid restoring similar level of expression of ExsA in all strains analysed. In addition, the effect of ExsB deletion on eukaryotic cells was detectable only when cells were infected at the low MOI of 1.

Indeed, the use of an excessive amount of bacteria in comparison with the cells (MOI 10) can completely mask small differences between strains, as already shown in some infection models (Sun et al. 2012). Of note, the effect on cytotoxicity of the deletion of ExsB counterpart in *Yersinia* could be detected at the high MOI of 20 (Bi et al. 2009).

Nevertheless, *in vivo* infection of mice by inhalation demonstrated that ExsB has an important role in *P. aeruginosa* virulence. A significant delay in animal mortality was observed in the absence of ExsB. Furthermore, *in vitro* characterization of T3SS activity showed a decrease in the secretion of T3SS substrates in the strain deleted of *exsB* gene and a decrease in the injection of toxins inside host cytoplasm. Indeed, examination of the PscC pilotin status in the  $\Delta exsB$  strain indicated that the diminution of T3SS activity following *exsB* deletion is related to ExsB “pilotin” role towards the

secretin PscC. Actually, membrane separation on sucrose gradient showed that the amount of oligomers in the outer membrane is considerably reduced in the absence of ExsB. Moreover, ExsB activity towards the secretin is similar to the one of its counterpart in *Y. enterocolitica*, where the pilotin promotes localization,

oligomerization and stabilization of the secretin (Table 1). On the contrary, T3SS pilotins from *S. flexneri* or *S. typhimurium* seem to belong to another family as they have a role only on the localization or on the stabilization of their secretin respectively, as described in Table 1.

Bacterial species	Pilotin	Secretin	Decrease in the amount of secretin oligomers	Mis-localisation of the secretin in the inner membrane	References
<i>Salmonella</i> spp.	InvH	InvG	no	yes	Daeﬂer S. et Russel M., 1998 ; Crago AM, et Koronakis V., 1998
<i>Shigella flexneri</i>	MxiM	MxiD	yes	no	Schuch R. et Maurelli AT., 2001
<i>Yersinia</i> spp	YscW	YscC	yes	yes*	Burghout P. et al., 2004
<i>P. aeruginosa</i>	ExsB	PscC	yes	yes*	This work

**Table 1 : Pilotins roles towards their secretin in diverse bacterial T3SS, in comparison with ExsB.**

\* by sucrose gradient.

The Lol system could be involved in driving ExsB, in complex with the PscC secretin, to the outer membrane, as it was already suggested for the pilotin from *S. flexneri* (Derrick 2008). This hypothesis is supported by the fact that PscC levels are considerably affected by LolB depletion (Hoang et al. 2011). It also implies a transient interaction between ExsB and the PscC secretin.

In agreement with this hypothesis, we were not able to detect any interaction between ExsB and PscC despite several attempts of Far-western overlay, pull-down and immunoprecipitation, with or without prior cross-linking, followed by immunoblot or Mass Spectrometry analysis (data not shown). Similar difficulties in detecting the interaction between other pilotin-secretin proteins were also reported in other T3SS. Indeed, the use of a crosslinker was essential to identify this interaction in *Shigella* and *Salmonella* species (Daeﬂer et al. 1998 ; Lario et al. 2005 ; Derrick 2008; Okon et al. 2008 ). In *Yersinia* spp., the two proteins did not co-purify (Burghout et al. 2004). However, the authors showed that the effect of the pilotin on the secretin was direct by using *Yersinia* strains lacking all

the other T3SS genes (Burghout et al. 2004).

Moreover, a small amount of secretin oligomers is found in the outer membrane of *P. aeruginosa* and its T3SS is still partially active in the absence of ExsB. This suggests that another T3SS protein could participate in PscC assembly. One good candidate is the PscJ lipoprotein, as its homolog MxiJ in *S. flexneri* T3SS (Schuch et al. 2001) shares with MxiM the role of pilotin. Actually, ExsB could be just one of the two actors sharing the role of pilotin for the PscC secretin. To confirm this hypothesis of two-player pilotins, a mutant *P. aeruginosa* strain lacking *pscJ* should be constructed and its phenotype should be analyzed regarding T3SS activity and PscC assembly.

Besides the investigation of the role of PscJ, another perspectives could be the study of the domains involved in the interaction between the ExsB pilotin and the secretin. For instance, the C-terminal domain of the secretin could harbor the interaction site for the pilotin, as for the T2SS of *D. dadanti* and *K. oxytoca* or for the T3SS of *S. flexneri* (Daeﬂer et al. 1997 ; Lario et al. 2005 ; Okon et al. 2008; Gu et al. 2012 ). It can also cause the secretin to



be dependent on the pilotin for its assembly in the outer membrane, as it was shown in the T2SS of *K. Oxytoca* or the T3SS of *Y. enterocolitica* (Burghout et al. 2004).

## **MATERIALS & METHODS**

### **Bacterial strains, plasmids, and growth conditions**

The bacterial strains, plasmids and oligonucleotids used in this study are described in the Tables 1 and 2.

Oligonucleotides		
Name	Sequence	Use
Delta_exsB_1	<u>5'</u> C C C G G G G A T G T G C T G G G C G A G G G G	SOE PCR to delete the gene coding for ExsB
Delta_exsB_2	<u>5'</u> G G C A A T G T A T C A C A T C C A G C A C C T C A C C T G C G	
Delta_exsB_3	<u>5'</u> G T G C T G G A T G T G A T A C A T T G C C T G C T G T T T C G G A	
Delta_exsB_4	<u>C C C G G G C C G A A G C G C T G G A C G A A G C</u>	
ExsB_Hind	<u>A A G C T T T C A A T C G T T G C C A G A T C T T T C</u>	Addition of <i>Hind</i> III restriction site at the C-terminus extremity of <i>exsB</i>
Xba_RBS_ExsB	<u>5'</u> T C T A G A A C G C C G C T G G A G G C	Addition of <i>Xba</i> I restriction site upstream of <i>exsB</i> RBS

**Table 1 : Oligonucleotides used in this study.** Restriction sites are underlined.

Plasmids used			
Name	Construction and characteristics	Antibiotic resistance	Source
pIA60	Plasmid derived from pUC18, with the <i>pcrGVHpopBD</i> and <i>exsCEBA</i> operons from CHA strain cloned in <i>Eco</i> RI	Amp/Cb	(Dacheux et al., 2001)
pIApC	Plasmid derived from pUCP20, used for protein expression under the control of the promoter pC from the <i>exsCEBA</i> operon	Amp/Cb	(Dacheux et al., 2001)
pS GFP	Plasmid used for GFP expression under the control of the promoter pS from ExoS toxin	Amp/Cb	Laboratory (unpublished)
pExoS-bla	Plasmid used for expression of ExoS toxin in fusion with $\beta$ -lactamase, under the control of its promoter pS	Amp/Cb	(Verove et al., 2012)
pDD2	Plasmid derived from pUCP20 for a constitutive overexpression of the T3SS activator ExsA	Amp/Cb	(Dacheux et al, 1999)
miniCTX	Plasmid allowing chromosomal integration at the attachment site <i>attB</i> from <i>P. aeruginosa</i>	Tc	(Hoang et al., 2000)
pTOPO	Plasmid for blunt-end cloning of PCR products	Km	Invitrogen
pEX100T	Plasmid coding for levan saccharase, used for chromosomal integration by homologous recombination in <i>P. aeruginosa</i>	Gm	(Schweizer and Hoang, 1995)
pRK2013	« helper » plasmid used to allow conjugation of a plasmid in <i>P. aeruginosa</i>	Km	(Ditta et al., 1980)
pFLp2	Plasmide coding for levan saccharase and for FLP recombinase allowing excision of DNA sequences included between the target sites of this enzyme (i.e. from miniCTX)	Amp/Cb	(Hoang et al., 1998)
pTOPO $\Delta$ exsB	Plasmid obtained by SOE PCR from pIA60 with Delta_exsB_1, 2, 3, 4 oligonucleotides, used for cloning in <i>E. coli</i> a fragment of the operon <i>exsCEBA</i> lacking <i>exsB</i> ,	Km	This work
pEX100T $\Delta$ exsB	Plasmid obtained by digestion of pEX100T and pTOPO $\Delta$ exsB with <i>Sma</i> I and <i>Eco</i> RI restriction enzymes, used for the deletion of <i>exsB</i> in <i>P. aeruginosa</i> chromosome.	Amp/Cb	This work
pTOPO RBS exsB	Plasmid obtained by amplification of RBS <i>exsB</i> with the oligonucléotides Xba_RBS_exsB et <i>exsB</i> _Hind from pIA60, used for cloning RBS <i>exsB</i> in <i>E. coli</i>	Km	This work
pIApC RBS exsB	Plasmid obtained by digestion of pIApC and pTOPO RBS <i>exsB</i> digested with <i>Nde</i> I and <i>Hind</i> III restriction enzymes, used for ExsB expression in <i>P. aeruginosa</i> under the control of its RBS and promoter pC	Amp/Cb	This work
miniCTX pC RBS exsB	Plasmid obtained by digestion of mini CTX and pTOPO RBS <i>exsB</i> , used for chromosomal expression of ExsB in <i>P. aeruginosa</i> under the control of its RBS and promoter pC	Tc	This work

**Table 2 : Plasmids used in this study : Construction, characteristics, and conferred antibiotic resistance** (Amp/Cb : ampicilline for *E. coli* and carbenicilline for *P. aeruginosa*, Km : kanamycine, Tc : tetracycline)

The *exsB* depletion mutant, CHA  $\Delta exsB$  was constructed in several steps. First, the Slice Overlapping Extension (SOE) technique was used to amplify the DNA sequence without *exsB*, that is to say the flanking regions of *exsB*. This DNA fragment was then cloned into the pEX100T vector with the help of the restriction site EcoRI and the plasmid was transformed in *Escherichia coli* TOP 10 competent cells (Invitrogen). A triparental conjugation involving *E. coli* TOP10 pEX100T  $\Delta exsB$ , *E. coli* pRK2013 and *Pseudomonas aeruginosa* CHA was realized to transfer the construct into *P. aeruginosa* CHA strain. The deletion mutant was selected on *Pseudomonas* Isolation Agar (PIA) plates containing 5% sucrose.

For the chromosomic complementation of this mutant, *exsB* gene with its own RBS was amplified and inserted into the pIAPC plasmid using the restriction sites XbaI and HindIII. The DNA fragment containing *exsB* downstream from its RBS and promoter pC was then extracted and cloned into the miniCTX vector. Finally, the complemented strain CHA  $\Delta exsB/exsB$  was obtained after transfer of the construct into the mutant strain CHA  $\Delta exsB$  and selection on media containing 5% sucrose.

The strains CHA *pexoS-bla*, CHA  $\Delta exsB$  *pexoS-bla*, and CHA  $\Delta exsB/exsB$  *pexoS-bla* were made by transformation of the *pexoS-bla* plasmid into *P. aeruginosa* strains and selection on PIA plates containing 500mg/L of carbenicilline. The strains CHA pDD2, CHA  $\Delta exsB$  pDD2, and CHA  $\Delta exsB/exsB$  pDD2 were obtained with the same method.

Bacterial cultures were grown in Luria-Bertani (LB) broth at 37°C and 300 rpm. The antibiotic was added at the appropriate concentration: 300mg/L for carbenicillin, 25 mg/L for kanamycin and 10 mg/L for tetracycline.

For T3SS induction in *P. aeruginosa* strains, the culture medium was depleted in

calcium with 5 mM EGTA and 20 mM MgCl<sub>2</sub>. Bacterial cultures of strains carrying pDD2 plasmid do not require T3SS induction.

Bacterial suspension was always used at an optical density (OD<sub>600</sub>) of 1, which corresponds to the exponential growth phase.

### ***In vitro* expression and secretion test**

The test was performed for *P. aeruginosa* strains overexpressing the activator ExsA. After induction of T3SS, 1 mL of bacterial suspension was centrifuged at 13 000g for 6 min. The supernatant and the cell extract concentrated 10 times were analysed by western blot.

### **Electrophoresis and western blot**

Proteins were separated by SDS-PAGE, using 15% acrylamide gels, and transferred onto nitrocellulose membranes. For the analysis of secretin oligomers, 8% acrylamide gels were used, and the proteins were transferred on PVDF membranes. The membranes were saturated in non fat milk 5% and incubated with primary antibodies raised against PopB (Goure et al. 2004), ExsB (Izore et al. 2011), PcrV (Goure et al. 2005), PscC (given by Viviana Job), XcpY (kind gift of R. Voulhoux), RpoA (NeoClone), and OprI-F (given by H. E. Gilleland). Secondary horseradish-peroxidase-associated antibodies were then added, and the proteins were revealed by chemiluminescence (Luminata<sup>TM</sup> Classico, Millipore)

### **Mice infection**

For each *P. aeruginosa* strain, ten BALB/C mice (males weighting 20g, from Harlan breeding) were infected by inhalation of 2x10<sup>6</sup> bacteria in order to induce pneumopathy. The survival was followed every 2 hours. For the statistical analysis, Kaplan Meyer curves were established and the Log Rank test was applied.

### Cytotoxicity assay

J774 cells were cultured at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in DMEM medium containing 10% of fetal bovine serum. The cytotoxicity assay was performed with 0.2 x 10<sup>6</sup> cells/well. *P. aeruginosa* at an OD<sub>600</sub> of 1 were used to infect the cells at a multiplicity of infection (MOI) of 1. The lactate dehydrogenase present in the supernatant after 1, 2 and 3 hours of infection was quantified with the cytotoxicity detection kit (LDH) from Roche.

HUVEC were isolated from human umbilical cord and cultured at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in EBM2 medium containing 10% of fetal bovine serum. The infection was set up at a MOI of 1 by *P. aeruginosa* strains at an OD<sub>600</sub> of 1. Cells were fixated with cold methanol 3 hours post infection. They were then labeled with a  $\beta$ -actin antibody coupled with a fluorescent secondary antibody, in order to visualize the entire cellular body. For each condition, the percentage of retracted cells was analyzed by measuring on three distinct pictures the cell surface with the ImageJ software.

### Injection of chimeric toxin

The injection of the chimeric toxin ExoS- $\beta$ -lactamase was assayed as described by Verove et al. (2011). BJAB cells and A549 cells were grown at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in RPMI medium containing 10% of fetal bovine serum. After 3 hours of infection by *P. aeruginosa* strains producing the chimeric toxin, BJAB cells were incubated with 1mM CCF2/AM (Invitrogen) during 30 min and their fluorescence was then analyzed by flow cytometry (FACS MoFlo). The CCF2/AM emits a green fluorescence but its cleavage by the  $\beta$ -lactamase domain of the chimeric toxin leads to the formation of a product emitting a blue fluorescence. For the infected A549 cells, the fluorescence was followed with an automated fluorimeter during the 2 hours of incubation in 2mM CCF2/AM.

### Counting of T3SS needles on bacteria surface

After induction of the T3SS, 500 $\mu$ L of *P. aeruginosa* suspension was collected and centrifuged at 13000g for 5 minutes at 4°C. Bacteria were concentrated 10 times in PBS. 3 $\mu$ L of this suspension was dropped onto copper grids 200, carbon and formvar coated and glow discharged. After 3 washes with filtered water, a negative staining was accomplished by incubation with 1% uranyl acetate for 1 minute. The samples were observed by electronic microscopy, with a FEI Tecnai 12 at a magnification of 23000. The T3SS were identified by their size, with a diameter of about 6.5 nm and a length of 70nm and a visible tip complex at one end. The number of needles present at the surface of the bacteria as well as the detached needles was determined on 60 pictures for the strain lacking *exsB* and 60 pictures for the complemented strain.

### Inner and outer membrane separation

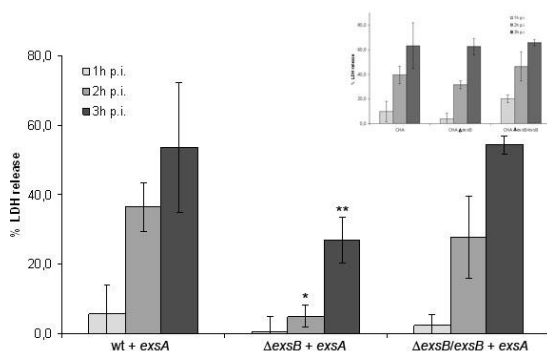
Membrane separation was achieved on the three *P. aeruginosa* strains overexpressing the T3SS activator ExsA. A sucrose gradient was used to separate the membranes according to their density, as described by (Viarre et al. 2009). The main steps of this procedure are the following. First, total membranes from 500 mL culture were prepared in 500 $\mu$ L of a buffer containing 8 mM Tris-HCl at pH 7.4, 20% sucrose (wt/wt), 4 mM ethylenediaminetetraacetic acid and protease inhibitor cocktail complete (Roche). They were then loaded on a 35–55% sucrose gradient and submitted to 72 hours of ultracentrifugation at 190 000g. Finally, 15 fractions of 750  $\mu$ L were collected and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. All the samples were analysed by SDS-PAGE and western blotting.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Véronique Collin-Faure (LCBM, CEA Grenoble) for flow cytometry analysis, Michel Ragno and Laura Pascalon (Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses Group, iRTSV) for technical help, Viviana Job and Andréa Dessen (Bacterial Pathogenesis Group, Institut de Biologie Structurale) for the helpful discussions.

CP received a fellowship from the IRTÉLIS Ph-D program from CEA.

## SUPPLEMENTARY DATA



**Supplementary figure 1 : Cytotoxicity assay on J774 mice macrophages.**

The percentage of intracellular lactate dehydrogenase (LDH) by the infected cells was measured 1, 2 and 3 hours post infection. The cytotoxicity assay was first realized with the wild type (wt), mutant lacking *exsB* ( $\Delta exsB$ ) and complemented ( $\Delta exsB/exsB$ ) strains of *P. aeruginosa*, as shown in the graph on the top and at the right. In these conditions, no difference was observed between all the strains. The assay was then realized with *P. aeruginosa* strains overexpressing T3SS activator ExsA. The stars represent a significative difference of cytotoxicity caused by  $\Delta exsB+exsA$  compared to  $wt+exsA$  and  $\Delta exsB/exsB+exsA$ .

## REFERENCES

- Allaoui, A., R. Scheen, C. Lambert de Rouvroit and G. R. Cornelis (1995). "VirG, a *Yersinia enterocolitica* lipoprotein involved in  $Ca^{2+}$  dependency, is related to *exsB* of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **177**(15): 4230-7.
- Bi, Y., Z. Du, H. Yang, Z. Guo, Y. Tan, Z. Zhu and R. Yang (2009). "Reduced apoptosis of mouse macrophages induced by *yscW* mutant of *Yersinia pestis* results from the reduced secretion of YopJ and relates to caspase-3 signal pathway." *Scand J Immunol* **70**(4): 358-67.
- Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Nuebuhr, K., Cabiaux, V., Parsot, C., Sansonetti, P. (1999). "The tripartite type III secretion of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes." *J Cell Biol* **147**(3): 683-93.
- Burghout, P., F. Beckers, E. de Wit, R. van Boxtel, G. R. Cornelis, J. Tommassen and M. Koster (2004). "Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in *Yersinia enterocolitica*." *J Bacteriol* **186**(16): 5366-75.
- Burghout, P., R. van Boxtel, P. Van Gelder, P. Ringler, S. A. Muller, J. Tommassen and M. Koster (2004). "Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*." *J Bacteriol* **186**(14): 4645-54.
- Carbonnelle, E., S. Helaine, L. Prouvensier, X. Nassif and V. Pelicic (2005). "Type IV pilus biogenesis in *Neisseria meningitidis*: PilW is involved in a step occurring after pilus assembly, essential for fibre stability and function." *Mol Microbiol* **55**(1): 54-64.
- Coburn, B., I. Sekirov and B. B. Finlay (2007). "Type III secretion systems and disease." *Clin Microbiol Rev* **20**(4): 535-49.
- Crago, A. M. and V. Koronakis (1998). "*Salmonella* InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization." *Mol Microbiol* **30**(1): 47-56.
- Daefler, S., I. Guilvout, K. R. Hardie, A. P. Pugsley and M. Russel (1997). "The C-terminal domain of the secretin PulD contains the binding site for its cognate chaperone, PulS, and confers PulS

- dependence on pIVf1 function." Mol Microbiol **24**(3): 465-75.
- Daefler, S. and M. Russel (1998). "The *Salmonella typhimurium* InvH protein is an outer membrane lipoprotein required for the proper localization of InvG." Mol Microbiol **28**(6): 1367-80.
- de Bentzmann, S. and P. Plesiat (2011). "The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections." Environ Microbiol.
- Derrick, J. (2008). "A pilot sheds light on secretin assembly." Structure **16**(10): 1441-2.
- Fotedar, R., E. Nayar, J. C. Samantray, Shriniwas, U. Banerjee, V. Dogra and A. Kumar (1989). "Cockroaches as vectors of pathogenic bacteria." J Commun Dis **21**(4): 318-22.
- Goure, J., P. Broz, O. Attree, G. R. Cornelis and I. Attree (2005). "Protective Anti-V Antibodies Inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* Translocon Assembly within Host Membranes." J Infect Dis **192**(2): 218-25.
- Goure, J., A. Pastor, E. Faudry, J. Chabert, A. Dessen and I. Attree (2004). "The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes." Infect Immun **72**(8): 4741-50.
- Govan, J. R. and V. Deretic (1996). "Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*." Microbiol Rev **60**(3): 539-74.
- Green, S. K., M. N. Schroth, J. J. Cho, S. K. Kominos and V. B. Vitanza-jack (1974). "Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*." Appl Microbiol **28**(6): 987-91.
- Gu, S., S. Rehman, X. Wang, V. E. Shevchik and R. W. Pickersgill (2012). "Structural and functional insights into the pilotin-secretin complex of the type II secretion system." PLoS Pathog **8**(2): e1002531.
- Hauser, A. R., E. Cobb, M. Bodi, D. Mariscal, J. Valles, J. N. Engel and J. Rello (2002). "Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*." Crit Care Med **30**(3): 521-8.
- Hoang, H. H., N. N. Nickerson, V. T. Lee, A. Kazimirova, M. Chami, A. P. Pugsley and S. Lory (2011). "Outer membrane targeting of *Pseudomonas aeruginosa* proteins shows variable dependence on the components of Bam and Lol machineries." MBio **2**(6).
- Izore, T., C. Perdu, V. Job, I. Attree, E. Faudry and A. Dessen (2011). "Structural characterization and membrane localization of ExsB from the type III secretion system (T3SS) of *Pseudomonas aeruginosa*." J Mol Biol **413**(1): 236-46.
- Koo, J., L. L. Burrows and P. L. Howell (2012). "Decoding the roles of pilotins and accessory proteins in secretin escort services." FEMS Microbiol Lett **328**(1): 1-12.
- Koster, M., W. Bitter, H. de Cock, A. Allaoui, G. R. Cornelis and J. Tommassen (1997). "The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex." Mol Microbiol **26**(4): 789-97.
- Lario, P. I., R. A. Pfuetzner, E. A. Frey, L. Creagh, C. Haynes, A. T. Maurelli and N. C. Strynadka (2005). "Structure and biochemical analysis of a secretin pilot protein." Embo J **24**(6): 1111-21.
- Lodge, J., G. R. Douce, Amin, II, A. J. Bolton, G. D. Martin, S. Chatfield, G. Dougan, N. L. Brown and J. Stephen (1995). "Biological and genetic characterization of TnphoA mutants of *Salmonella typhimurium* TML in the context of gastroenteritis." Infect Immun **63**(3): 762-9.
- Okon, M., T. F. Moraes, P. I. Lario, A. L. Creagh, C. A. Haynes, N. C. Strynadka

- and L. P. McIntosh (2008). "Structural characterization of the type-III pilot-secretin complex from *Shigella flexneri*." Structure **16**(10): 1544-54.
- Pastor, A., J. Chabert, M. Louwagie, J. Garin and I. Attree (2005). "PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle." FEMS Microbiol Lett **253**(1): 95-101.
- Pati, N. B., V. Vishwakarma, S. Jaiswal, B. Periaswamy, W. D. Hardt and M. Suar (2013). "Deletion of invH gene in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium limits the secretion of Sip effector proteins." Microbes Infect **15**(1): 66-73.
- Remans, K., K. Vercammen, J. Bodilis and P. Cornelis (2010). "Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in *Pseudomonas aeruginosa*." Microbiology **156**(Pt 9): 2597-607.
- Remold, S. K., C. K. Brown, J. E. Farris, T. C. Hundley, J. A. Perpich and M. E. Purdy (2011). "Differential Habitat Use and Niche Partitioning by *Pseudomonas* Species in Human Homes." Microb Ecol.
- Roy-Burman, A., R. H. Savel, S. Racine, B. L. Swanson, N. S. Revadigar, J. Fujimoto, T. Sawa, D. W. Frank and J. P. Wiener-Kronish (2001). "Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections." J Infect Dis **183**(12): 1767-74.
- Schuch, R. and A. T. Maurelli (2001). "MxiM and MxiJ, base elements of the Mxi-Spa type III secretion system of *Shigella*, interact with and stabilize the MxiD secretin in the cell envelope." J Bacteriol **183**(24): 6991-8.
- Shevchik, V. E. and G. Condemine (1998). "Functional characterization of the *Erwinia chrysanthemi* OutS protein, an element of a type II secretion system." Microbiology **144** ( Pt 11): 3219-28.
- Strateva, T. and D. Yordanov (2009). "*Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance." J Med Microbiol **58**(Pt 9): 1133-48.
- Sun, Y., M. Karmakar, P. R. Taylor, A. Rietsch and E. Pearlman (2012). "ExoS and ExoT ADP ribosyltransferase activities mediate *Pseudomonas aeruginosa* keratitis by promoting neutrophil apoptosis and bacterial survival." J Immunol **188**(4): 1884-95.
- Szeto, T. H., A. Dessen and V. Pelicic "Structure/function analysis of *Neisseria meningitidis* PilW, a conserved protein that plays multiple roles in type IV pilus biology." Infect Immun **79**(8): 3028-35.
- Thiolet, J. M. G., C. ; Jarno, P. ; L'Hériveau, F. ; Metzger, M. H. ; Tronel, H. ; Coignard, B. (2007). "Prevalence des infections nosocomiales, France, 2006." Bulletin épidémiologique hebdomadaire **51** **52**: 5.
- Verove, J., C. Bernarde, Y. S. Bohn, F. Boulay, M. J. Rabiet, I. Attree and F. Cretin (2012). "Injection of *Pseudomonas aeruginosa* Exo toxins into host cells can be modulated by host factors at the level of translocon assembly and/or activity." PLoS One **7**(1): e30488.
- Viarre, V., E. Cascales, G. Ball, G. P. Michel, A. Filloux and R. Voulhoux (2009). "HxcQ liposecretin is self-piloted to the outer membrane by its N-terminal lipid anchor." J Biol Chem **284**(49): 33815-23.
- Watson, P. R., S. M. Paulin, A. P. Bland, P. W. Jones and T. S. Wallis (1995). "Characterization of intestinal invasion by *Salmonella typhimurium* and *Salmonella dublin* and effect of a mutation in the invH gene." Infect Immun **63**(7): 2743-54.
- Young, V. M. (1977). *Pseudomonas Aeruginosa: Ecological Aspects and Patient Colonization*, Books on Demand.



# **Références** **bibliographiques**





-A-

- Agrain, C., I. Sorg, C. Paroz and G. R. Cornelis (2005). "Secretion of YscP from *Yersinia enterocolitica* is essential to control the length of the injectisome needle but not to change the type III secretion substrate specificity." Mol Microbiol **57**(5): 1415-27.
- Aiello, D., J. D. Williams, H. Majgier-Baranowska, I. Patel, N. P. Peet, J. Huang, S. Lory, T. L. Bowlin and D. T. Moir (2010). "Discovery and characterization of inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion." Antimicrob Agents Chemother **54**(5): 1988-99.
- Akeda, Y. and J. E. Galan (2004). "Genetic analysis of the *Salmonella enterica* type III secretion-associated ATPase InvC defines discrete functional domains." J Bacteriol **186**(8): 2402-12.
- Akeda, Y. and J. E. Galan (2005). "Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion." Nature **437**(7060): 911-5.
- Allaoui, A., R. Scheen, C. Lambert de Rouvroit and G. R. Cornelis (1995). "VirG, a *Yersinia enterocolitica* lipoprotein involved in Ca<sup>2+</sup> dependency, is related to exsB of *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **177**(15): 4230-7.
- Allewelt, M., F. T. Coleman, M. Grout, G. P. Priebe and G. B. Pier (2000). "Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread." Infect Immun **68**(7): 3998-4004.
- Alonso, A., E. Campanario and J. L. Martinez (1999). "Emergence of multidrug-resistant mutants is increased under antibiotic selective pressure in *Pseudomonas aeruginosa*." Microbiology **145** ( Pt 10): 2857-62.
- Andrade, A., J. P. Pardo, N. Espinosa, G. Perez-Hernandez and B. Gonzalez-Pedrajo (2007). "Enzymatic characterization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion ATPase EscN." Arch Biochem Biophys **468**(1): 121-7.
- Angus, A. A., D. J. Evans, J. T. Barbieri and S. M. Fleiszig (2010). "The ADP-ribosylation domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS is required for membrane bleb niche formation and bacterial survival within epithelial cells." Infect Immun **78**(11): 4500-10.

-B-

- Balasubramanian, D., L. Schneper, H. Kumari and K. Mathee (2013). "A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence." Nucleic Acids Res **41**(1): 1-20.
- Ball, G., E. Durand, A. Lazdunski and A. Filloux (2002). "A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*." Mol Microbiol **43**(2): 475-85.
- Berg, G., L. Eberl and A. Hartmann (2005). "The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria." Environ Microbiol **7**(11): 1673-85.
- Berg, H. C. (2003). "The rotary motor of bacterial flagella." Annu Rev Biochem **72**: 19-54.
- Berthelot, P., I. Attree, P. Plesiat, J. Chabert, S. de Bentzmann, B. Pozzetto and F. Grattard (2003). "Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia isolates: evidence for a possible association between O serotypes and exo genes." J Infect Dis **188**(4): 512-8.
- Bi, Y., Z. Du, H. Yang, Z. Guo, Y. Tan, Z. Zhu and R. Yang (2009). "Reduced apoptosis of mouse macrophages induced by yscW mutant of *Yersinia pestis* results from the reduced secretion of YopJ and relates to caspase-3 signal pathway." Scand J Immunol **70**(4): 358-67.
- Biemans-Oldehinkel, E., N. Sal-Man, W. Deng, L. J. Foster and B. B. Finlay (2011). "Quantitative proteomic analysis reveals formation of an EscL-EscQ-EscN type III complex in enteropathogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol **193**(19): 5514-9.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Bjornfot, A. C., M. Lavander, A. Forsberg and H. Wolf-Watz (2009). "Autoproteolysis of YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* is important for regulation of expression and secretion of Yop proteins." J Bacteriol **191**(13): 4259-67.
- Blaylock, B., K. E. Riordan, D. M. Missiakas and O. Schneewind (2006). "Characterization of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL." J Bacteriol **188**(10): 3525-34.
- Bleves, S., A. Lazdunski and A. Filloux (1996). "Membrane topology of three Xcp proteins involved in exoprotein transport by *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **178**(14): 4297-300.
- Bleves, S., V. Viarre, R. Salacha, G. P. Michel, A. Filloux and R. Voulhoux (2010). "Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons." Int J Med Microbiol **300**(8): 534-43.
- Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Nuebuhr, K., Cabiaux, V., Parsot, C., Sansonetti, P. (1999). "The tripartite type III secretion of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes." J Cell Biol **147**(3): 683-93.
- Blocker, A., N. Jouihri, E. Larquet, P. Gounon, F. Ebel, C. Parsot, P. Sansonetti and A. Allaoui (2001). "Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretion." Mol Microbiol **39**(3): 652-63.
- Blocker, A., K. Komoriya and S. Aizawa (2003). "Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3027-30.
- Boonyom, R., M. H. Karavolos, D. M. Bulmer and C. M. Khan (2010). "*Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) type III secretion of SopD involves N- and C-terminal signals and direct binding to the InvC ATPase." Microbiology **156**(Pt 6): 1805-14.
- Bornhorst, B. J. and J. J. Falke (2011). "Reprint of: Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags." Protein Expr Purif.
- Bozue, J., C. K. Cote, W. Webster, A. Bassett, S. Tobery, S. Little and W. Swietnicki (2012). "A *Yersinia pestis* YscN ATPase mutant functions as a live attenuated vaccine against bubonic plague in mice." FEMS Microbiol Lett **332**(2): 113-21.

- Bricha, S. O., K. ; Oulkheir, S. ; EL Haloui, N. E. ; Attarassi B. (2009). "Facteurs de virulence et épidémiologie lies au *Pseudomonas aeruginosa*." *Revue Tunisienne d'Infectiologie* **2**: 7.
- Broms, J. E., P. J. Edqvist, A. Forsberg and M. S. Francis (2006). "Tetratricopeptide repeats are essential for PcrH chaperone function in *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion." *FEMS Microbiol Lett* **256**(1): 57-66.
- Brutinel, E. D. and T. L. Yahr (2008). "Control of gene expression by type III secretory activity." *Curr Opin Microbiol* **11**(2): 128-33.
- Burghout, P., F. Beckers, E. de Wit, R. van Boxtel, G. R. Cornelis, J. Tommassen and M. Koster (2004). "Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in *Yersinia enterocolitica*." *J Bacteriol* **186**(16): 5366-75.
- Burghout, P., R. van Boxtel, P. Van Gelder, P. Ringler, S. A. Muller, J. Tommassen and M. Koster (2004). "Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*." *J Bacteriol* **186**(14): 4645-54.
- Burns, R. E., A. McDaniel-Craig and A. Sukhan (2008). "Site-directed mutagenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system protein PscJ reveals an essential role for surface-localized residues in needle complex function." *Microb Pathog* **45**(3): 225-30.
- Buttner, D. and S. Y. He (2009). "Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria." *Plant Physiol* **150**(4): 1656-64.
- Button, J. E. and J. E. Galan (2011). "Regulation of chaperone/effector complex synthesis in a bacterial type III secretion system." *Mol Microbiol* **81**(6): 1474-83.

-C-

- Carbonnelle, E., S. Helaine, L. Prouvensier, X. Nassif and V. Pelicic (2005). "Type IV pilus biogenesis in *Neisseria meningitidis*: PilW is involved in a step occurring after pilus assembly, essential for fibre stability and function." *Mol Microbiol* **55**(1): 54-64.
- Cathcart, G. R., D. Quinn, B. Greer, P. Harriott, J. F. Lynas, B. F. Gilmore and B. Walker (2011). "Novel inhibitors of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor LasB: a potential therapeutic approach for the attenuation of virulence mechanisms in pseudomonal infection." *Antimicrob Agents Chemother* **55**(6): 2670-8.
- Cattoir, V., G. Narasimhan, D. Skurnik, H. Aschard, D. Roux, R. Ramphal, J. Jyot and S. Lory (2013). "Transcriptional Response of Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to Human Respiratory Mucus." *MBio* **3**(6).
- Cavallo, J. D. F., R. (2004). *Pseudomonas aeruginosa*, Pôle santé sécurité soins du médiateur de la république.
- Chemani, C., A. Imbert, S. de Bentzmann, M. Pierre, M. Wimmerova, B. P. Guery and K. Faure (2009). "Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands." *Infect Immun* **77**(5): 2065-75.
- Chen, S., Beeby, M., Murphy, G. E., Leadbetter, J. R., Hendrixson, D. R., Briegel, A., Li, Z., Shi, J., Tocheva, E. I., Muller, A., Dobro, M. J., Jensen, J. G. (2011). "Structural diversity of bacterial flagellar motors." *EMBO Journal* **30**: 2972-81.
- Cherradi, Y., L. Schiavolin, S. Moussa, A. Meghraoui, A. Meksem, L. Biskri, M. Azarkan, A. Allaoui and A. Botteaux (2013). "Interplay between predicted inner-rod and gatekeeper in controlling substrate specificity of the type III secretion system." *Mol Microbiol*.
- Cho, J. C. and J. M. Tiedje (2000). "Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil." *Appl Environ Microbiol* **66**(12): 5448-56.
- Cisz, M., P. C. Lee and A. Rietsch (2008). "ExoS controls the cell contact-mediated switch to effector secretion in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **190**(8): 2726-38.
- Claret, L., S. R. Calder, M. Higgins and C. Hughes (2003). "Oligomerization and activation of the FliI ATPase central to bacterial flagellum assembly." *Mol Microbiol* **48**(5): 1349-55.
- Clatworthy, A. E., E. Pierson and D. T. Hung (2007). "Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy." *Nat Chem Biol* **3**(9): 541-8.
- Coburn, B., I. Sekirov and B. B. Finlay (2007). "Type III secretion systems and disease." *Clin Microbiol Rev* **20**(4): 535-49.
- Collin, S., I. Guilvout, N. N. Nickerson and A. P. Pugsley (2011). "Sorting of an integral outer membrane protein via the lipoprotein-specific Lol pathway and a dedicated lipoprotein pilotin." *Mol Microbiol* **80**(3): 655-65.
- Colvin, K. M., Y. Irie, C. S. Tart, R. Urbano, J. C. Whitney, C. Ryder, P. L. Howell, D. J. Wozniak and M. R. Parsek (2012). "The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix." *Environ Microbiol* **14**(8): 1913-28.
- Cooper, C. (2011). The virulence chaperone network associated with the SPI-2 encoded Type III Secretion System of *Salmonella enterica*, McMaster University.
- Cordes, F. S., K. Komoriya, E. Larquet, S. Yang, E. H. Egelman, A. Blocker and S. M. Lea (2003). "Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*." *J Biol Chem* **278**(19): 17103-7.
- Cornelis, G. R. (2006). "The type III secretion injectisome." *Nat Rev Microbiol* **4**(11): 811-25.
- Costa, S. C., A. M. Schmitz, F. F. Jahufar, J. D. Boyd, M. Y. Cho, M. A. Glicksman and C. F. Lesser (2012). "A new means to identify type 3 secreted effectors: functionally interchangeable class IB chaperones recognize a conserved sequence." *MBio* **3**(1).
- Costerton, J. W. (2001). "Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection." *Trends Microbiol* **9**(2): 50-2.
- Cotter, P. (2011). "Microbiology: Molecular syringes scratch the surface." *Nature* **475**(7356): 301-3.
- Cowell, B. A., D. J. Evans and S. M. Fleiszig (2005). "Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on *Pseudomonas aeruginosa* invasion." *FEMS Microbiol Lett* **250**(1): 71-6.
- Cowell, B. A., S. S. Twining, J. A. Hobden, M. S. Kwong and S. M. Fleiszig (2003). "Mutation of lasA and lasB reduces *Pseudomonas aeruginosa* invasion of epithelial cells." *Microbiology* **149**(Pt 8): 2291-9.

- Crago, A. M. and V. Koronakis (1998). "Salmonella InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization." *Mol Microbiol* **30**(1): 47-56.
- Crepin, V. F., S. Prasannan, R. K. Shaw, R. K. Wilson, E. Creasey, C. M. Abe, S. Knutton, G. Frankel and S. Matthews (2005). "Structural and functional studies of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III needle complex protein EscJ." *Mol Microbiol* **55**(6): 1658-70.

**-D-**

- D'Argenio, D. A., L. A. Gallagher, C. A. Berg and C. Manoil (2001). "Drosophila as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection." *J Bacteriol* **183**(4): 1466-71.
- Daefler, S., I. Guilvout, K. R. Hardie, A. P. Pugsley and M. Russel (1997). "The C-terminal domain of the secretin PulD contains the binding site for its cognate chaperone, PulS, and confers PulS dependence on pIVf1 function." *Mol Microbiol* **24**(3): 465-75.
- Daefler, S. and M. Russel (1998). "The *Salmonella typhimurium* InvH protein is an outer membrane lipoprotein required for the proper localization of InvG." *Mol Microbiol* **28**(6): 1367-80.
- Davies, J., A. Dewar, A. Bush, T. Pitt, D. Gruenert, D. M. Geddes and E. W. Alton (1999). "Reduction in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to native cystic fibrosis epithelium with anti-asialoGM1 antibody and neuraminidase inhibition." *Eur Respir J* **13**(3): 565-70.
- Davis, A. J., D. A. Diaz and J. Mecsas (2010). "A dominant-negative needle mutant blocks type III secretion of early but not late substrates in *Yersinia*." *Mol Microbiol* **76**(1): 236-59.
- de Bentzmann, S. and P. Plesiat (2011). "The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections." *Environ Microbiol*.
- de Bentzmann, S., P. Roger, F. Dupuit, O. Bajolet-Laudinat, C. Fuchey, M. C. Plotkowski and E. Puchelle (1996). "Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells." *Infect Immun* **64**(5): 1582-8.
- de Kievit, T. R. and B. H. Iglewski (2000). "Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships." *Infect Immun* **68**(9): 4839-49.
- Dean, P. (2011). "Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection." *FEMS Microbiol Rev* **35**(6): 1100-25.
- Deane, J. E., P. Abrusci, S. Johnson and S. M. Lea (2010). "Timing is everything: the regulation of type III secretion." *Cell Mol Life Sci* **67**(7): 1065-75.
- Deane, J. E., P. Roversi, F. S. Cordes, S. Johnson, R. Kenjale, S. Daniell, F. Booy, W. D. Picking, W. L. Picking, A. J. Blocker and S. M. Lea (2006). "Molecular model of a type III secretion system needle: Implications for host-cell sensing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(33): 12529-33.
- Deligianni, E., S. Pattison, D. Berrar, N. G. Ternan, R. W. Haylock, J. E. Moore, S. J. Elborn and J. S. Dooley (2010). "*Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates of similar RAPD genotype exhibit diversity in biofilm forming ability in vitro." *BMC Microbiol* **10**: 38.
- Deng, Q. and J. T. Barbieri (2008). "Modulation of host cell endocytosis by the type III cytotoxin, *Pseudomonas* ExoS." *Traffic* **9**(11): 1948-57.
- Derrick, J. (2008). "A pilot sheds light on secretin assembly." *Structure* **16**(10): 1441-2.
- Dewoody, R. S., P. M. Merritt and M. M. Marketon (2013). "Regulation of the *Yersinia* type III secretion system: traffic control." *Front Cell Infect Microbiol* **3**: 4.
- Diaz, M. H., C. M. Shaver, J. D. King, S. Musunuri, J. A. Kazzaz and A. R. Hauser (2008). "*Pseudomonas aeruginosa* induces localized immunosuppression during pneumonia." *Infect Immun* **76**(10): 4414-21.
- Diaz, M. R., J. M. King and T. L. Yahr (2011). "Intrinsic and Extrinsic Regulation of Type III Secretion Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa*." *Front Microbiol* **2**: 89.
- Diepold, A., M. Amstutz, S. Abel, I. Sorg, U. Jenal and G. R. Cornelis (2010). "Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome." *Embo J* **29**(11): 1928-40.
- Dittrich, M., S. Hayashi and K. Schulten (2004). "ATP hydrolysis in the betaTP and betaDP catalytic sites of F1-ATPase." *Biophys J* **87**(5): 2954-67.
- Doig, P., N. R. Smith, T. Todd and R. T. Irvin (1987). "Characterization of the binding of *Pseudomonas aeruginosa* alginate to human epithelial cells." *Infect Immun* **55**(6): 1517-22.
- Duncan, M. C., R. G. Linington and V. Auerbuch (2012). "Chemical inhibitors of the type three secretion system: disarming bacterial pathogens." *Antimicrob Agents Chemother* **56**(11): 5433-41.
- Durand, E., A. Bernadac, G. Ball, A. Lazdunski, J. N. Sturgis and A. Filloux (2003). "Type II protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the pseudopilus is a multifibrillar and adhesive structure." *J Bacteriol* **185**(9): 2749-58.

**-E-**

- Eichelberg, K., C. C. Ginocchio and J. E. Galan (1994). "Molecular and functional characterization of the *Salmonella typhimurium* invasion genes invB and invC: homology of InvC to the F0F1 ATPase family of proteins." *J Bacteriol* **176**(15): 4501-10.
- El-Solh, A. A., A. Hattemer, A. R. Hauser, A. Alhajhusain and H. Vora (2012). "Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia." *Crit Care Med* **40**(4): 1157-63.
- Engel, J. and P. Balachandran (2009). "Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease." *Curr Opin Microbiol* **12**(1): 61-6.
- Engel, L. S., J. M. Hill, A. R. Caballero, L. C. Green and R. J. O'Callaghan (1998). "Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*." *J Biol Chem* **273**(27): 16792-7.

- Engel, L. S., J. A. Hobden, J. M. Moreau, M. C. Callegan, J. M. Hill and R. J. O'Callaghan (1997). "Pseudomonas deficient in protease IV has significantly reduced corneal virulence." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**(8): 1535-42.
- Erhardt, M., K. Namba and K. T. Hughes (2010). "Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(11): a000299.

-F-

- Faudry, E., V. Job, A. Dessen, I. Attree and V. Forge (2007). "Type III secretion system translocator has a molten globule conformation both in its free and chaperone-bound forms." *Febs J* **274**(14): 3601-10.
- Faudry, E., G. Vernier, E. Neumann, V. Forge and I. Attree (2006). "Synergistic Pore Formation by Type III Toxin Translocators of *Pseudomonas aeruginosa*." *Biochemistry* **45**(26): 8117-8123.
- Fauvarque, M. O., E. Bergeret, J. Chabert, D. Dacheux, M. Satre and I. Attree (2002). "Role and activation of type III secretion system genes in *Pseudomonas aeruginosa*-induced Drosophila killing." *Microb Pathog* **32**(6): 287-95.
- Feldman, M., R. Bryan, S. Rajan, L. Scheffler, S. Brunnert, H. Tang and A. Prince (1998). "Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection." *Infect Immun* **66**(1): 43-51.
- Felisberto-Rodrigues, C., E. Durand, M. S. Aschtgen, S. Blangy, M. Ortiz-Lombardia, B. Douzi, C. Cambillau and E. Cascales (2011). "Towards a structural comprehension of bacterial type VI secretion systems: characterization of the TssJ-TssM complex of an *Escherichia coli* pathovar." *PLoS Pathog* **7**(11): e1002386.
- Feltman, H., G. Schulert, S. Khan, M. Jain, L. Peterson and A. R. Hauser (2001). "Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*." *Microbiology* **147**(Pt 10): 2659-69.
- Filloux, A., A. Hachani and S. Bleves (2008). "The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes." *Microbiology* **154**(Pt 6): 1570-83.
- Filloux, A. V., I. (2003). "Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne." *Médecine sciences* **19**(1): 7.
- Finck-Barbancon, V., T. L. Yahr and D. W. Frank (1998). "Identification and characterization of SpcU, a chaperone required for efficient secretion of the ExoU cytotoxin." *J Bacteriol* **180**(23): 6224-31.
- Fotadar, R., E. Nayar, J. C. Samantray, Shrinivas, U. Banerjee, V. Dogra and A. Kumar (1989). "Cockroaches as vectors of pathogenic bacteria." *J Commun Dis* **21**(4): 318-22.
- Frank, D. W. and B. H. Iglewski (1991). "Cloning and sequence analysis of a trans-regulatory locus required for exoenzyme S synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **173**(20): 6460-8.
- Fu, Y. and J. E. Galan (1998). "Identification of a specific chaperone for SptP, a substrate of the centisome 63 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol* **180**(13): 3393-9.
- Fujii, T., M. Cheung, A. Blanco, T. Kato, A. J. Blocker and K. Namba (2012). "Structure of a type III secretion needle at 7-A resolution provides insights into its assembly and signaling mechanisms." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(12): 4461-6.

-G-

- Galan-Vasquez, E., B. Luna and A. Martinez-Antonio (2011). "The Regulatory Network of *Pseudomonas aeruginosa*." *Microb Inform Exp* **1**(1): 3.
- Galan, J. E. (2008). "Energizing type III secretion machines: what is the fuel?" *Nat Struct Mol Biol* **15**(2): 127-8.
- Galan, J. E. and A. Collmer (1999). "Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells." *Science* **284**(5418): 1322-8.
- Galle, M., S. Jin, P. Bogaert, M. Haegman, P. Vandenabeele and R. Beyaert (2012). "The *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System Has an Exotoxin S/T/Y Independent Pathogenic Role during Acute Lung Infection." *PLoS One* **7**(7): e41547.
- Gamez, A., R. Mukerjee, M. Alayyoubi, M. Ghassemian and P. Ghosh (2012). "Structure and Interactions of the Cytoplasmic Domain of the *Yersinia* Type III Secretion Protein YscD." *J Bacteriol* **194**(21): 5949-58.
- Gauthier, A. and B. B. Finlay (2003). "Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **185**(23): 6747-55.
- Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, T. Berkelman and C. I. Kado (1985). "Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria." *J Bacteriol* **164**(2): 918-21.
- Gay, R. G.-R., L. K. ; Kim, O. A. ; Grier, M. ; Hanley, B. ; Donovan, P. ; Draper, M. P. ; Tanaka, S. K. ; Levy, S. B. (2007). *Efficacy of MAR inhibitors in a Pseudomonas aeruginosa pneumonia model*. 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Paratek pharmaceuticals.
- Gebus, C., E. Faudry, Y. S. Bohn, S. Elsen and I. Attree (2008). "Oligomerization of PcrV and LcrV, protective antigens of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pestis*." *J Biol Chem* **283**(35): 23940-9.
- Gendrin, C., C. Contreras-Martel, S. Bouillot, S. Elsen, D. Lemaire, D. A. Skoufias, P. Huber, I. Attree and A. Dessen (2012). "Structural basis of cytotoxicity mediated by the type III secretion toxin ExoU from *Pseudomonas aeruginosa*." *PLoS Pathog* **8**(4): e1002637.
- Ghafoor, A., I. D. Hay and B. H. Rehm (2011). "Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture." *Appl Environ Microbiol* **77**(15): 5238-46.
- Ghosh, P. (2004). "Process of protein transport by the type III secretion system." *Microbiol Mol Biol Rev* **68**(4): 771-95.
- Gibson, R. L., J. L. Burns and B. W. Ramsey (2003). "Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis." *Am J Respir Crit Care Med* **168**(8): 918-51.
- Goguen, J. P., Ning WO/2009/061491 <http://www.sumobrain.com/patents/WO2009061491.html> (2009). Type III Secretion Inhibitors and uses thereof.

- Goldberg, J. B., M. J. Coyne, Jr., A. N. Neely and I. A. Holder (1995). "Avirulence of a *Pseudomonas aeruginosa* algC mutant in a burned-mouse model of infection." *Infect Immun* **63**(10): 4166-9.
- Gomez, E. B., M. G. Catlett and S. L. Forsburg (2002). "Different phenotypes in vivo are associated with ATPase motif mutations in *Schizosaccharomyces pombe* minichromosome maintenance proteins." *Genetics* **160**(4): 1305-18.
- Gophna, U., E. Z. Ron and D. Graur (2003). "Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events." *Gene* **312**: 151-63.
- Goranson, J., A. K. Hovey and D. W. Frank (1997). "Functional analysis of *exsC* and *exsB* in regulation of exoenzyme S production by *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **179**(5): 1646-54.
- Goure, J., A. Pastor, E. Faudry, J. Chabert, A. Dessen and I. Attree (2004). "The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes." *Infect Immun* **72**(8): 4741-50.
- Govan, J. R. and V. Deretic (1996). "Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*." *Microbiol Rev* **60**(3): 539-74.
- Graslund, S., P. Nordlund, J. Weigelt, B. M. Hallberg, J. Bray, O. Gileadi, S. Knapp, U. Oppermann, C. Arrowsmith, R. Hui, J. Ming, S. dhe-Paganon, H. W. Park, A. Savchenko, A. Yee, A. Edwards, R. Vincentelli, C. Cambillau, R. Kim, S. H. Kim, Z. Rao, Y. Shi, T. C. Terwilliger, C. Y. Kim, L. W. Hung, G. S. Waldo, Y. Peleg, S. Albeck, T. Unger, O. Dym, J. Prilusky, J. L. Sussman, R. C. Stevens, S. A. Lesley, I. A. Wilson, A. Joachimiak, F. Collart, I. Dementieva, M. I. Donnelly, W. H. Eschenfeldt, Y. Kim, L. Stols, R. Wu, M. Zhou, S. K. Burley, J. S. Emtage, J. M. Sauder, D. Thompson, K. Bain, J. Luz, T. Gheyi, F. Zhang, S. Atwell, S. C. Almo, J. B. Bonanno, A. Fiser, S. Swaminathan, F. W. Studier, M. R. Chance, A. Sali, T. B. Acton, R. Xiao, L. Zhao, L. C. Ma, J. F. Hunt, L. Tong, K. Cunningham, M. Inouye, S. Anderson, H. Janjua, R. Shastry, C. K. Ho, D. Wang, H. Wang, M. Jiang, G. T. Montelione, D. I. Stuart, R. J. Owens, S. Daenke, A. Schutz, U. Heinemann, S. Yokoyama, K. Bussow and K. C. Gunsalus (2008). "Protein production and purification." *Nat Methods* **5**(2): 135-46.
- Green, S. K., M. N. Schroth, J. J. Cho, S. K. Kominos and V. B. Vitanza-jack (1974). "Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*." *Appl Microbiol* **28**(6): 987-91.
- Gu, S., S. Rehman, X. Wang, V. E. Shevchik and R. W. Pickersgill (2012). "Structural and functional insights into the pilotin-secretin complex of the type II secretion system." *PLoS Pathog* **8**(2): e1002531.
- Guan, L., M. Ehrmann, H. Yoneyama and T. Nakae (1999). "Membrane topology of the xenobiotic-exporting subunit, MexB, of the MexA,B-OprM extrusion pump in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Biol Chem* **274**(15): 10517-22.
- Guilvout, I., M. Chami, A. Engel, A. P. Pugsley and N. Bayan (2006). "Bacterial outer membrane secretin PulD assembles and inserts into the inner membrane in the absence of its pilotin." *Embo J* **25**(22): 5241-9.
- Gupta, S. K., R. S. Berk, S. Masinick and L. D. Hazlett (1994). "Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1." *Infect Immun* **62**(10): 4572-9.
- H-**
- Hakki, M., A. P. Limaye, H. W. Kim, K. A. Kirby, L. Corey and M. Boeckh (2007). "Invasive *Pseudomonas aeruginosa* infections: high rate of recurrence and mortality after hematopoietic cell transplantation." *Bone Marrow Transplant* **39**(11): 687-93.
- Hall, R. A. (2004). "Studying protein-protein interactions via blot overlay or Far Western blot." *Methods Mol Biol* **261**: 167-74.
- Hardie, K. R., S. Lory and A. P. Pugsley (1996). "Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein." *Embo J* **15**(5): 978-88.
- Hardie, K. R., A. Seydel, I. Guilvout and A. P. Pugsley (1996). "The secretin-specific, chaperone-like protein of the general secretory pathway: separation of proteolytic protection and piloting functions." *Mol Microbiol* **22**(5): 967-76.
- Hauser, A. R. (2009). "The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection." *Nat Rev Microbiol* **7**(9): 654-65.
- Hauser, A. R., E. Cobb, M. Bodi, D. Mariscal, J. Valles, J. N. Engel and J. Rello (2002). "Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*." *Crit Care Med* **30**(3): 521-8.
- Hentzer, M., K. Riedel, T. B. Rasmussen, A. Heydorn, J. B. Andersen, M. R. Parsek, S. A. Rice, L. Eberl, S. Molin, N. Hoiby, S. Kjelleberg and M. Givskov (2002). "Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound." *Microbiology* **148**(Pt 1): 87-102.
- Hoang, H. H., N. N. Nickerson, V. T. Lee, A. Kazimirova, M. Chami, A. P. Pugsley and S. Lory (2011). "Outer membrane targeting of *Pseudomonas aeruginosa* proteins shows variable dependence on the components of Bam and Lol machineries." *MBio* **2**(6).
- Hobb, R. I., J. A. Fields, C. M. Burns and S. A. Thompson (2009). "Evaluation of procedures for outer membrane isolation from *Campylobacter jejuni*." *Microbiology* **155**(Pt 3): 979-88.
- Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Janeway and R. A. Ezekowitz (1999). "Phylogenetic perspectives in innate immunity." *Science* **284**(5418): 1313-8.
- Hoge, R. P., A. ; Rosenau, F. ; Wilhelm S. (2010). *Weapons of a pathogen: Proteases and their role in virulence of Pseudomonas aeruginosa*. A. Mendez-Vilas.
- Hoiczky, E. and G. Blobel (2001). "Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(8): 4669-74.
- Hood, R. D., P. Singh, F. Hsu, T. Guvener, M. A. Carl, R. R. Trinidad, J. M. Silverman, B. B. Ohlson, K. G. Hicks, R. L. Plemel, M. Li, S. Schwarz, W. Y. Wang, A. J. Merz, D. R. Goodlett and J. D. Mougous (2010). "A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria." *Cell Host Microbe* **7**(1): 25-37.

- Hornef, M. W., A. Roggenkamp, A. M. Geiger, M. Hogardt, C. A. Jacobi and J. Heesemann (2000). "Triggering the ExoS regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: A GFP-reporter analysis of exoenzyme (Exo) S, ExoT and ExoU synthesis." Microb Pathog **29**(6): 329-43.
- Houot, L., A. Fanni, S. de Bentzmann and C. Bordi (2012). "A bacterial two-hybrid genome fragment library for deciphering regulatory networks of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*." Microbiology **158**(Pt 8): 1964-71.
- Hovey, A. K. and D. W. Frank (1995). "Analyses of the DNA-binding and transcriptional activation properties of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon." J Bacteriol **177**(15): 4427-36.
- Hritonenko, V., J. J. Mun, C. Tam, N. C. Simon, J. T. Barbieri, D. J. Evans and S. M. Fleiszig (2011). "Adenylate cyclase activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoY can mediate bleb-niche formation in epithelial cells and contributes to virulence." Microb Pathog **51**(5): 305-12.
- Hubert, D. L. B., M. (2012). "Atteinte respiratoire de la mucoviscidose de l'enfance à l'âge adulte." Archives de pédiatrie **19**: S17-S19.

**-I-**

- Imada, K., T. Minamino, A. Tahara and K. Namba (2007). "Structural similarity between the flagellar type III ATPase FliI and F1-ATPase subunits." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(2): 485-90.
- Izore, T., V. Job and A. Dessen (2011). "Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system." Structure **19**(5): 603-12.
- Izore, T., C. Perdu, V. Job, I. Attree, E. Faudry and A. Dessen (2011). "Structural characterization and membrane localization of ExsB from the type III secretion system (T3SS) of *Pseudomonas aeruginosa*." J Mol Biol **413**(1): 236-46.

**-J-**

- Jackson, M. W. and G. V. Plano (2000). "Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system." FEMS Microbiol Lett **186**(1): 85-90.
- Jain, S., K. B. Moscicka, M. P. Bos, E. Pachulec, M. C. Stuart, W. Keegstra, E. J. Boekema and C. van der Does (2011). "Structural characterization of outer membrane components of the type IV pili system in pathogenic *Neisseria*." PLoS One **6**(1): e16624.
- Job, V., P. J. Mattei, D. Lemaire, I. Attree and A. Dessen (2010). "Structural basis of chaperone recognition of type III secretion system minor translocator proteins." J Biol Chem **285**(30): 23224-32.
- Johnson, S. and A. Blocker (2008). "Characterization of soluble complexes of the *Shigella flexneri* type III secretion system ATPase." FEMS Microbiol Lett **286**(2): 274-8.
- Jouihri, N., M. P. Sory, A. L. Page, P. Gounon, C. Parsot and A. Allaoui (2003). "MxiK and MxiN interact with the Spa47 ATPase and are required for transit of the needle components MxiH and MxiI, but not of Ipa proteins, through the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*." Mol Microbiol **49**(3): 755-67.
- Journet, L., C. Agrain, P. Broz and G. R. Cornelis (2003). "The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler." Science **302**(5651): 1757-60.

**-K-**

- Kessler, E., M. Safrin, W. R. Abrams, J. Rosenbloom and D. E. Ohman (1997). "Inhibitors and specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA." J Biol Chem **272**(15): 9884-9.
- Keyser, P., M. Elofsson, S. Rosell and H. Wolf-Watz (2008). "Virulence blockers as alternatives to antibiotics: type III secretion inhibitors against Gram-negative bacteria." J Intern Med **264**(1): 17-29.
- Khan, N. H., M. Ahsan, S. Yoshizawa, S. Hosoya, A. Yokota and K. Kogure (2008). "Multilocus sequence typing and phylogenetic analyses of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from the ocean." Appl Environ Microbiol **74**(20): 6194-205.
- Kiernan, J. A. (2000). "Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do." Microscopy today **00-1**: 4.
- Kipnis, E., T. Sawa and J. Wiener-Kronish (2006). "Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis." Med Mal Infect **36**(2): 78-91.
- Knowles, T. J., A. Scott-Tucker, M. Overduin and I. R. Henderson (2009). "Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly." Nat Rev Microbiol **7**(3): 206-14.
- Konishi, M., M. Kanbe, J. L. McMurry and S. Aizawa (2009). "Flagellar formation in C-ring-defective mutants by overproduction of FliI, the ATPase specific for flagellar type III secretion." J Bacteriol **191**(19): 6186-91.
- Koo, J., L. L. Burrows and P. L. Howell (2012). "Decoding the roles of pilotins and accessory proteins in secretin escort services." FEMS Microbiol Lett **328**(1): 1-12.
- Korotkov, K. V., T. Gonen and W. G. Hol (2011). "Secretins: dynamic channels for protein transport across membranes." Trends Biochem Sci **36**(8): 433-43.
- Koster, M., W. Bitter, H. de Cock, A. Allaoui, G. R. Cornelis and J. Tommassen (1997). "The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex." Mol Microbiol **26**(4): 789-97.

**-L-**

- Laarman, A. J., B. W. Bardoel, M. Ruyken, J. Fernie, F. J. Milder, J. A. van Strijp and S. H. Rooijackers (2012). "*Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways." J Immunol **188**(1): 386-93.

- Lanini, S., S. D'Arezzo, V. Puro, L. Martini, F. Imperi, P. Piselli, M. Montanaro, S. Paoletti, P. Visca and G. Ippolito (2011). "Molecular epidemiology of a *Pseudomonas aeruginosa* hospital outbreak driven by a contaminated disinfectant-soap dispenser." *PLoS One* **6**(2): e17064.
- Lara-Tejero, M., J. Kato, S. Wagner, X. Liu and J. E. Galan (2011). "A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems." *Science* **331**(6021): 1188-91.
- Lario, P. I., R. A. Pfuetzner, E. A. Frey, L. Creagh, C. Haynes, A. T. Maurelli and N. C. Strynadka (2005). "Structure and biochemical analysis of a secretin pilot protein." *Embo J* **24**(6): 1111-21.
- Lau, G. W., H. Ran, F. Kong, D. J. Hassett and D. Mavrodi (2004). "*Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice." *Infect Immun* **72**(7): 4275-8.
- Ledizet, M., T. S. Murray, S. Puttagunta, M. D. Slade, V. J. Quagliarello and B. I. Kazmierczak (2012). "The Ability of Virulence Factor Expression by *Pseudomonas aeruginosa* to Predict Clinical Disease in Hospitalized Patients." *PLoS One* **7**(11): e49578.
- Lee, P. C., C. M. Stopford, A. G. Svenson and A. Rietsch (2010). "Control of effector export by the *P. aeruginosa* type III secretion proteins PcrG and PcrV." *Mol Microbiol*.
- Lee, S. H. and J. E. Galan (2003). "InvB is a type III secretion-associated chaperone for the *Salmonella enterica* effector protein SopE." *J Bacteriol* **185**(24): 7279-84.
- Lee, V. T. and O. Schneewind (2002). "Yop fusions to tightly folded protein domains and their effects on *Yersinia enterocolitica* type III secretion." *J Bacteriol* **184**(13): 3740-5.
- Lee, V. T., R. S. Smith, B. Tummler and S. Lory (2005). "Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection." *Infect Immun* **73**(3): 1695-705.
- Leid, J. G., C. J. Willson, M. E. Shirtliff, D. J. Hassett, M. R. Parsek and A. K. Jeffers (2005). "The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing." *J Immunol* **175**(11): 7512-8.
- Leidal, K. G., K. L. Munson, M. C. Johnson and G. M. Denning (2003). "Metalloproteases from *Pseudomonas aeruginosa* degrade human RANTES, MCP-1, and ENA-78." *J Interferon Cytokine Res* **23**(6): 307-18.
- Lister, P. D., D. J. Wolter and N. D. Hanson (2009). "Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms." *Clin Microbiol Rev* **22**(4): 582-610.
- Lodge, J., G. R. Douce, Amin, II, A. J. Bolton, G. D. Martin, S. Chatfield, G. Dougan, N. L. Brown and J. Stephen (1995). "Biological and genetic characterization of TnpHoA mutants of *Salmonella typhimurium* TML in the context of gastroenteritis." *Infect Immun* **63**(3): 762-9.
- Loquet, A., N. G. Sgourakis, R. Gupta, K. Giller, D. Riedel, C. Goosmann, C. Griesinger, M. Kolbe, D. Baker, S. Becker and A. Lange (2012). "Atomic model of the type III secretion system needle." *Nature* **486**(7402): 276-9.
- Lorenz, C. and D. Buttner (2009). "Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria." *J Bacteriol* **191**(5): 1414-28.
- Lorenz, C., J. Hausner and D. Buttner (2012). "HrcQ provides a docking site for early and late type III secretion substrates from *Xanthomonas*." *PLoS One* **7**(11): e51063.
- Lory, S., M. Merighi and M. Hyodo (2009). "Multiple activities of c-di-GMP in *Pseudomonas aeruginosa*." *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* **53**: 51-2.
- Lyczak, J. B., C. L. Cannon and G. B. Pier (2000). "Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist." *Microbes Infect* **2**(9): 1051-60.

-M-

- Ma, L., K. D. Jackson, R. M. Landry, M. R. Parsek and D. J. Wozniak (2006). "Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment." *J Bacteriol* **188**(23): 8213-21.
- Ma, L., H. Lu, A. Sprinkle, M. R. Parsek and D. J. Wozniak (2007). "*Pseudomonas aeruginosa* Psl is a galactose- and mannose-rich exopolysaccharide." *J Bacteriol* **189**(22): 8353-6.
- Macnab, R. M. (2004). "Type III flagellar protein export and flagellar assembly." *Biochim Biophys Acta* **1694**(1-3): 207-17.
- Mahmood, F., A. Hakimiyani, V. Jayaraman, S. Wood, G. Sivaramakrishnan, T. Rehman, B. L. Reuhs, S. Chubinskaya and S. Shafikhani (2013). "A novel human antimicrobial factor targets *Pseudomonas aeruginosa* through its Type III Secretion System." *J Med Microbiol*.
- Makin, S. A. and T. J. Beveridge (1996). "The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces." *Microbiology* **142** ( Pt 2): 299-307.
- Malloy, J. L., R. A. Veldhuizen, B. A. Thibodeaux, R. J. O'Callaghan and J. R. Wright (2005). "*Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**(2): L409-18.
- Manting, E. H. and A. J. Driessen (2000). "*Escherichia coli* translocase: the unravelling of a molecular machine." *Mol Microbiol* **37**(2): 226-38.
- Maresso, A. W., M. R. Baldwin and J. T. Barbieri (2004). "Ezrin/radixin/moesin proteins are high affinity targets for ADP-ribosylation by *Pseudomonas aeruginosa* ExoS." *J Biol Chem* **279**(37): 38402-8.
- Maris, P. (1991). "Résistance aux antiseptiques et aux antibiotiques de 700 souches bactériennes à Gram négatif." *Ann Rech Vet* **22**: 12.
- Markham, A. P., B. S. Barrett, R. Esfandiary, W. L. Picking, W. D. Picking, S. B. Joshi and C. R. Middaugh (2010). "Formulation and immunogenicity of a potential multivalent type III secretion system-based protein vaccine." *J Pharm Sci* **99**(11): 4497-509.
- Marlovits, T. C., T. Kubori, M. Lara-Tejero, D. Thomas, V. M. Unger and J. E. Galan (2006). "Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome." *Nature* **441**(7093): 637-40.



- Marlovits, T. C., T. Kubori, A. Sukhan, D. R. Thomas, J. E. Galan and V. M. Unger (2004). "Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex." *Science* **306**(5698): 1040-2.
- Marlovits, T. C. and C. E. Stebbins (2010). "Type III secretion systems shape up as they ship out." *Curr Opin Microbiol* **13**(1): 47-52.
- Martinez, J. L. and F. Baquero (2000). "Mutation frequencies and antibiotic resistance." *Antimicrob Agents Chemother* **44**(7): 1771-7.
- Matheson, N. R., J. Potempa and J. Travis (2006). "Interaction of a novel form of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease (aeruginolysin) with interleukin-6 and interleukin-8." *Biol Chem* **387**(7): 911-5.
- Mattei, P. J., E. Faudry, V. Job, T. Izore, I. Attree and A. Dessen (2011). "Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon." *Febs J* **278**(3): 414-26.
- Mattmann, M. E. and H. E. Blackwell (2010). "Small molecules that modulate quorum sensing and control virulence in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Org Chem* **75**(20): 6737-46.
- McClure, C. D. and N. L. Schiller (1992). "Effects of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on human monocyte-derived macrophages." *J Leukoc Biol* **51**(2): 97-102.
- Mikkelsen, H., G. Ball, C. Giraud and A. Filloux (2009). "Expression of *Pseudomonas aeruginosa* CupD fimbrial genes is antagonistically controlled by RcsB and the EAL-containing PvrR response regulators." *PLoS One* **4**(6): e6018.
- Mikkelsen, H., N. J. Bond, M. E. Skindersoe, M. Givskov, K. S. Lilley and M. Welch (2009). "Biofilms and type III secretion are not mutually exclusive in *Pseudomonas aeruginosa*." *Microbiology* **155**(Pt 3): 687-98.
- Minamino, T., B. Gonzalez-Pedrajo, M. Kihara, K. Namba and R. M. Macnab (2003). "The ATPase FliI can interact with the type III flagellar protein export apparatus in the absence of its regulator, FliH." *J Bacteriol* **185**(13): 3983-8.
- Minamino, T., K. Imada and K. Namba (2008). "Molecular motors of the bacterial flagella." *Curr Opin Struct Biol* **18**(6): 693-701.
- Minamino, T. and R. M. MacNab (2000). "FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity." *Mol Microbiol* **37**(6): 1494-503.
- Minamino, T. and K. Namba (2008). "Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export." *Nature* **451**(7177): 485-8.
- Mizgerd, J. P. and S. J. Skerrett (2008). "Animal models of human pneumonia." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **294**(3): L387-98.
- Moraes, T. F., T. Spreter and N. C. Strynadka (2008). "Piecing together the type III injectisome of bacterial pathogens." *Curr Opin Struct Biol* **18**(2): 258-66.
- Morita-Ishihara, T., M. Ogawa, H. Sagara, M. Yoshida, E. Katayama and C. Sasakawa (2006). "*Shigella* Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery." *J Biol Chem* **281**(1): 599-607.
- Morrison, A. J., Jr. and R. P. Wenzel (1984). "Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*." *Rev Infect Dis* **6 Suppl 3**: S627-42.
- Moscoso, J. A., H. Mikkelsen, S. Heeb, P. Williams and A. Filloux (2011). "The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling." *Environ Microbiol* **13**(12): 3128-38.
- Muh, U., B. J. Hare, B. A. Duerkop, M. Schuster, B. L. Hanzelka, R. Heim, E. R. Olson and E. P. Greenberg (2006). "A structurally unrelated mimic of a *Pseudomonas aeruginosa* acyl-homoserine lactone quorum-sensing signal." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(45): 16948-52.
- Muller, S. A., C. Pozidis, R. Stone, C. Meesters, M. Chami, A. Engel, A. Economou and H. Stahlberg (2006). "Double hexameric ring assembly of the type III protein translocase ATPase HrcN." *Mol Microbiol* **61**(1): 119-25.
- N-
- Nanao, M., S. Ricard-Blum, A. M. Di Guilmi, D. Lemaire, D. Lascoux, J. Chabert, I. Attree and A. Dessen (2003). "Type III secretion proteins PcrV and PcrG from *Pseudomonas aeruginosa* form a 1:1 complex through high affinity interactions." *BMC Microbiol* **3**(1): 21.
- Narita, S. (2011). "ABC transporters involved in the biogenesis of the outer membrane in gram-negative bacteria." *Biosci Biotechnol Biochem* **75**(6): 1044-54.
- Natale, P., T. Bruser and A. J. Driessen (2008). "Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms." *Biochim Biophys Acta* **1778**(9): 1735-56.
- Nicolay, N. T., J. M. ; Talon, D. ; Poujol, I. ; Bernet, C. ; Carbonne, A. ; Dumartin, C. ; Raclot, I. ; Sénéchal, H. ; Bouraoui, L. ; Coignard, B. (2008). "Signalement des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, France, août 2001 - juin 2006" *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*: 4.
- Nordfelth, R., A. M. Kauppi, H. A. Norberg, H. Wolf-Watz and M. Elofsson (2005). "Small-molecule inhibitors specifically targeting type III secretion." *Infect Immun* **73**(5): 3104-14.
- Nordfelth, R. and H. Wolf-Watz (2001). "YopB of *Yersinia enterocolitica* is essential for YopE translocation." *Infect Immun* **69**(5): 3516-8.
- Noreddin, A. M. S., G. ; Elkhatib, W. ; Noreddin, E. ; Shibl, A. (2012). *Inhibition of Adhesion and Invasion of Pseudomonas aeruginosa to Lung Epithelial Cells: A Model of Cystic Fibrosis Infection*, Elvis Malcolm Iruen.
- Nouwen, N., N. Ranson, H. Saibil, B. Wolpensinger, A. Engel, A. Ghazi and A. P. Pugsley (1999). "Secretin PulD: association with pilot PulS, structure, and ion-conducting channel formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14): 8173-7.
- O-
- O'Callaghan, J., F. J. Reen, C. Adams and F. O'Gara (2011). "Low oxygen induces the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* via modulation of the small RNAs rsmZ and rsmY." *Microbiology* **157**(Pt 12): 3417-28.

- Oguchi, Y., K. Takeda, S. Watanabe, N. Yokota, K. Miki and H. Tokuda (2008). "Opening and closing of the hydrophobic cavity of LolA coupled to lipoprotein binding and release." *J Biol Chem* **283**(37): 25414-20.
- Okabe, M., T. Minamino, K. Imada, K. Namba and M. Kihara (2009). "Role of the N-terminal domain of FliI ATPase in bacterial flagellar protein export." *FEBS Lett* **583**(4): 743-8.
- Okon, M., T. F. Moraes, P. I. Lario, A. L. Creagh, C. A. Haynes, N. C. Strynadka and L. P. McIntosh (2008). "Structural characterization of the type-III pilot-secretin complex from *Shigella flexneri*." *Structure* **16**(10): 1544-54.

-P-

- Pallen, M. J., C. M. Bailey and S. A. Beatson (2006). "Evolutionary links between FliH/YscL-like proteins from bacterial type III secretion systems and second-stalk components of the FoF1 and vacuolar ATPases." *Protein Sci* **15**(4): 935-41.
- Pallen, M. J., S. A. Beatson and C. M. Bailey (2005). "Bioinformatics, genomics and evolution of non-flagellar type-III secretion systems: a Darwinian perspective." *FEMS Microbiol Rev* **29**(2): 201-29.
- Pan, N., C. Lee and J. Goguen (2007). "High throughput screening for small-molecule inhibitors of type III secretion in *Yersinia pestis*." *Adv Exp Med Biol* **603**: 367-75.
- Pastor, A., J. Chabert, M. Louwagie, J. Garin and I. Attree (2005). "PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle." *FEMS Microbiol Lett* **253**(1): 95-101.
- Pati, N. B., V. Vishwakarma, S. Jaiswal, B. Periaswamy, W. D. Hardt and M. Suar (2013). "Deletion of invH gene in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium limits the secretion of Sip effector proteins." *Microbes Infect* **15**(1): 66-73.
- Paul, K., M. Erhardt, T. Hirano, D. F. Blair and K. T. Hughes (2008). "Energy source of flagellar type III secretion." *Nature* **451**(7177): 489-92.
- Pier, G. B. (2007). "*Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity." *Int J Med Microbiol* **297**(5): 277-95.
- Pollack, M. (1995). *Pseudomonas aeruginosa*. Churchill Livingstone, New York, NY, G. L. Mandell, R. Dolan, and J. E. Bennett.
- Poole, K., K. Krebes, C. McNally and S. Neshat (1993). "Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon." *J Bacteriol* **175**(22): 7363-72.
- Pozidis, C., A. Chalkiadaki, A. Gomez-Serrano, H. Stahlberg, I. Brown, A. P. Tampakaki, A. Lustig, G. Sianidis, A. S. Politou, A. Engel, N. J. Panopoulos, J. Mansfield, A. P. Pugsley, S. Karamanou and A. Economou (2003). "Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization." *J Biol Chem* **278**(28): 25816-24.

-Q-

- Quinaud, M., J. Chabert, E. Faudry, E. Neumann, D. Lemaire, A. Pastor, S. Elsen, A. Dessen and I. Attree (2005). "The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Biol Chem* **280**(43): 36293-300.

-R-

- Rahman, R. N., L. P. Geok, M. Basri and A. B. Salleh (2005). "Physical factors affecting the production of organic solvent-tolerant protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain K." *Bioresour Technol* **96**(4): 429-36.
- Rahme, L. G., F. M. Ausubel, H. Cao, E. Drenkard, B. C. Goumnerov, G. W. Lau, S. Mahajan-Miklos, J. Plotnikova, M. W. Tan, J. Tsongalis, C. L. Walendziewicz and R. G. Tompkins (2000). "Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16): 8815-21.
- Rashid, M. H. and A. Kornberg (2000). "Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4885-90.
- Regnath, T., M. Kreutzberger, S. Illing, R. Oehme and O. Liesenfeld (2004). "Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in households of patients with cystic fibrosis." *Int J Hyg Environ Health* **207**(6): 585-8.
- Remans, K., K. Vercammen, J. Bodilis and P. Cornelis (2010). "Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in *Pseudomonas aeruginosa*." *Microbiology* **156**(Pt 9): 2597-607.
- Remold, S. K., C. K. Brown, J. E. Farris, T. C. Hundley, J. A. Perpich and M. E. Purdy (2011). "Differential Habitat Use and Niche Partitioning by *Pseudomonas* Species in Human Homes." *Microb Ecol*.
- Ricard, J. D. (2012). "New therapies for pneumonia." *Curr Opin Pulm Med* **18**(3): 181-6.
- Rietsch, A., I. Vallet-Gely, S. L. Dove and J. J. Mekalanos (2005). "ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(22): 8006-11.
- Riordan, K. E., J. A. Sorg, B. J. Berube and O. Schneewind (2008). "Impassable YscP substrates and their impact on the *Yersinia enterocolitica* type III secretion pathway." *J Bacteriol* **190**(18): 6204-16.
- Riordan, K. E. and C. The University of (2008). *Substrate Selection and Specificity in Yersinia Type III Secretion Machines*. University of Chicago.
- Ritchie, J. M. and M. K. Waldor (2005). "The locus of enterocyte effacement-encoded effector proteins all promote enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenicity in infant rabbits." *Infect Immun* **73**(3): 1466-74.
- Rodgers, L., A. Gamez, R. Riek and P. Ghosh (2008). "The type III secretion chaperone SycE promotes a localized disorder-to-order transition in the natively unfolded effector YopE." *J Biol Chem* **283**(30): 20857-63.
- Rodgers, L., R. Mukerjee, S. Birtalan, D. Friedberg and P. Ghosh (2010). "A solvent-exposed patch in chaperone-bound YopE is required for translocation by the type III secretion system." *J Bacteriol* **192**(12): 3114-22.

- Roy-Burman, A., R. H. Savel, S. Racine, B. L. Swanson, N. S. Revadigar, J. Fujimoto, T. Sawa, D. W. Frank and J. P. Wiener-Kronish (2001). "Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections." *J Infect Dis* **183**(12): 1767-74.
  - Russell, A. B., R. D. Hood, N. K. Bui, M. LeRoux, W. Vollmer and J. D. Mougous (2011). "Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells." *Nature* **475**(7356): 343-7.
- S-
- Saitou, K., K. Furuhashi, Y. Kawakami and M. Fukuyama (2009). "Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from cockroaches captured in hospitals in Japan, and their antibiotic susceptibility." *Biocontrol Sci* **14**(4): 155-9.
  - Sanowar, S., P. Singh, R. A. Pfuetzner, I. Andre, H. Zheng, T. Spreter, N. C. Strynadka, T. Gonen, D. Baker, D. R. Goodlett and S. I. Miller (2010). "Interactions of the transmembrane polymeric rings of the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* type III secretion system." *MBio* **1**(3).
  - Sato, H., K. Okinaga and H. Saito (1988). "Role of pili in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn infection." *Microbiol Immunol* **32**(2): 131-9.
  - Sawa, T., M. Ohara, K. Kurahashi, S. S. Twining, D. W. Frank, D. B. Doroques, T. Long, M. A. Gropper and J. P. Wiener-Kronish (1998). "In vitro cellular toxicity predicts *Pseudomonas aeruginosa* virulence in lung infections." *Infect Immun* **66**(7): 3242-9.
  - Schalk, I. J. and L. Guillon (2012). "Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis." *Environ Microbiol*.
  - Schoehn, G., A. M. Di Guilmi, D. Lemaire, I. Attree, W. Weissenhorn and A. Dessen (2003). "Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*." *Embo J* **22**(19): 4957-67.
  - Schroeder, R. J., S. N. Ahmed, Y. Zhu, E. London and D. A. Brown (1998). "Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains." *J Biol Chem* **273**(2): 1150-7.
  - Schuch, R. and A. T. Maurelli (2001). "MxiM and MxiJ, base elements of the Mxi-Spa type III secretion system of *Shigella*, interact with and stabilize the MxiD secretin in the cell envelope." *J Bacteriol* **183**(24): 6991-8.
  - Schulz, B. E., C. C. Boyle, T. Sieber, M. Saad, W. Broughton and W. Deakin (2006). Role of Proteins Secreted by Rhizobia in Symbiotic Interactions with Leguminous Roots. *Microbial Root Endophytes*, Springer Berlin Heidelberg. **9**: 71-87.
  - Shafikhani, S. H., C. Morales and J. Engel (2008). "The *Pseudomonas aeruginosa* type III secreted toxin ExoT is necessary and sufficient to induce apoptosis in epithelial cells." *Cell Microbiol* **10**(4): 994-1007.
  - Shaver, C. M. and A. R. Hauser (2004). "Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung." *Infect Immun* **72**(12): 6969-77.
  - Shen, D. K., L. Quenee, M. Bonnet, L. Kuhn, M. Derouazi, D. Lamotte, B. Toussaint and B. Polack (2008). "Orf1/SpcS chaperones ExoS for type three secretion by *Pseudomonas aeruginosa*." *Biomed Environ Sci* **21**(2): 103-9.
  - Sheth, H. B., K. K. Lee, W. Y. Wong, G. Srivastava, O. Hindsgaul, R. S. Hodges, W. Paranchych and R. T. Irvin (1994). "The pili of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAK and PAO bind specifically to the carbohydrate sequence beta GalNAc(1-4)beta Gal found in glycosphingolipids asialo-GM1 and asialo-GM2." *Mol Microbiol* **11**(4): 715-23.
  - Shevchik, V. E. and G. Condemine (1998). "Functional characterization of the *Erwinia chrysanthemi* OutS protein, an element of a type II secretion system." *Microbiology* **144** ( Pt 11): 3219-28.
  - Shevchik, V. E., J. Robert-Baudouy and G. Condemine (1997). "Specific interaction between OutD, an *Erwinia chrysanthemi* outer membrane protein of the general secretory pathway, and secreted proteins." *Embo J* **16**(11): 3007-16.
  - Shiue, S. J., K. M. Kao, W. M. Leu, L. Y. Chen, N. L. Chan and N. T. Hu (2006). "XpsE oligomerization triggered by ATP binding, not hydrolysis, leads to its association with XpsL." *Embo J* **25**(7): 1426-35.
  - Sigal, C. T., W. Zhou, C. A. Buser, S. McLaughlin and M. D. Resh (1994). "Amino-terminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(25): 12253-7.
  - Soberon-Chavez, G., F. Lepine and E. Deziel (2005). "Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*." *Appl Microbiol Biotechnol* **68**(6): 718-25.
  - Song, Y., M. Baer, R. Srinivasan, J. Lima, G. Yarranton, C. Bebbington and S. V. Lynch (2012). "PcrV antibody-antibiotic combination improves survival in *Pseudomonas aeruginosa*-infected mice." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**(8): 1837-45.
  - Soong, G., A. Muir, M. I. Gomez, J. Waks, B. Reddy, P. Planet, P. K. Singh, Y. Kaneko, M. C. Wolfgang, Y. S. Hsiao, L. Tong and A. Prince (2006). "Bacterial neuraminidase facilitates mucosal infection by participating in biofilm production." *J Clin Invest* **116**(8): 2297-2305.
  - Soong, G., D. Parker, M. Magargee and A. S. Prince (2008). "The type III toxins of *Pseudomonas aeruginosa* disrupt epithelial barrier function." *J Bacteriol* **190**(8): 2814-21.
  - Sorg, J. A., B. Blaylock and O. Schneewind (2006). "Secretion signal recognition by YscN, the *Yersinia* type III secretion ATPase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(44): 16490-5.
  - Sorg, J. A., N. C. Miller, M. M. Marketon and O. Schneewind (2005). "Rejection of impassable substrates by *Yersinia* type III secretion machines." *J Bacteriol* **187**(20): 7090-102.
  - Soscia, C., A. Hachani, A. Bernadac, A. Filloux and S. Bleves (2007). "Cross talk between type III secretion and flagellar assembly systems in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **189**(8): 3124-32.
  - Sousa, L. P. d., A. F. d. Silva, N. O. Calil, M. G. Oliveira, S. S. r. d. Silva and N. d. R. B. Raposo (2011). "In vitro inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion by Xylitol." *Brazilian Archives of Biology and Technology* **54**: 877-884.
  - Spaeth, K. E., Y. S. Chen and R. H. Valdivia (2009). "The Chlamydia type III secretion system C-ring engages a chaperone-effector protein complex." *PLoS Pathog* **5**(9): e1000579.

- Spreter, T., C. K. Yip, S. Sanowar, I. Andre, T. G. Kimbrough, M. Vuckovic, R. A. Pfuetzner, W. Deng, A. C. Yu, B. B. Finlay, D. Baker, S. I. Miller and N. C. Strynadka (2009). "A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system." *Nat Struct Mol Biol* **16**(5): 468-76.
- Stathopoulos, P. B., G. A. Scholz, Y. M. Hwang, J. A. Rumfeldt, J. R. Lepock and E. M. Meiering (2004). "Sonication of proteins causes formation of aggregates that resemble amyloid." *Protein Sci* **13**(11): 3017-27.
- Stone, C. B., D. C. Bulir, J. D. Gilchrist, R. K. Toor and J. B. Mahony (2010). "Interactions between flagellar and type III secretion proteins in *Chlamydia pneumoniae*." *BMC Microbiol* **10**: 18.
- Stone, C. B., D. L. Johnson, D. C. Bulir, J. D. Gilchrist and J. B. Mahony (2008). "Characterization of the putative type III secretion ATPase CdsN (Cpn0707) of *Chlamydophila pneumoniae*." *J Bacteriol* **190**(20): 6580-8.
- Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory and M. V. Olson (2000). "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen." *Nature* **406**(6799): 959-64.
- Strateva, T. and I. Mitov (2011). "Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections." *Annals of Microbiology* **61**(4): 717-732.
- Strateva, T. and D. Yordanov (2009). "*Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance." *J Med Microbiol* **58**(Pt 9): 1133-48.
- Sun, J. and J. T. Barbieri (2003). "*Pseudomonas aeruginosa* ExoT ADP-ribosylates CT10 regulator of kinase (Crk) proteins." *J Biol Chem* **278**(35): 32794-800.
- Sun, J. and J. T. Barbieri (2004). "ExoS Rho GTPase-activating protein activity stimulates reorganization of the actin cytoskeleton through Rho GTPase guanine nucleotide disassociation inhibitor." *J Biol Chem* **279**(41): 42936-44.
- Sun, Y., M. Karmakar, P. R. Taylor, A. Rietsch and E. Pearlman (2012). "ExoS and ExoT ADP ribosyltransferase activities mediate *Pseudomonas aeruginosa* keratitis by promoting neutrophil apoptosis and bacterial survival." *J Immunol* **188**(4): 1884-95.
- Sundin, C., J. Thelaus, J. E. Broms and A. Forsberg (2004). "Polarisation of type III translocation by *Pseudomonas aeruginosa* requires PcrG, PcrV and PopN." *Microb Pathog* **37**(6): 313-22.
- Swietnicki, W., D. Carmany, M. Retford, M. Guelta, R. Dorsey, J. Bozue, M. S. Lee and M. A. Olson (2011). "Identification of Small-Molecule Inhibitors of *Yersinia pestis* Type III Secretion System YscN ATPase." *PLoS One* **6**(5): e19716.
- Szeto, T. H., A. Dessen and V. Pelicic "Structure/function analysis of *Neisseria meningitidis* PilW, a conserved protein that plays multiple roles in type IV pilus biology." *Infect Immun* **79**(8): 3028-35.

-T-

- Tang, H., M. Kays and A. Prince (1995). "Role of *Pseudomonas aeruginosa* pili in acute pulmonary infection." *Infect Immun* **63**(4): 1278-85.
- Thibault, J., E. Faudry, C. Ebel, I. Attree and S. Elsen (2009). "Anti-activator ExsD forms a 1:1 complex with ExsA to inhibit transcription of type III secretion operons." *J Biol Chem* **284**(23): 15762-70.
- Thiolet, J. M. G., C. ; Jarno, P. ; L'Héritau, F. ; Metzger, M. H. ; Tronel, H. ; Coignard, B. (2007). "Prevalence des infections nosocomiales, France, 2006." *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* **51** 52: 5.
- Tielker, D., S. Hacker, R. Loris, M. Strathmann, J. Wingender, S. Wilhelm, F. Rosenau and K. E. Jaeger (2005). "*Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation." *Microbiology* **151**(Pt 5): 1313-23.
- Toussaint, B., I. Delic-Attree and P. M. Vignais (1993). "*Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the algD promoter." *Biochem Biophys Res Commun* **196**(1): 416-421.
- Tsuji, A., Y. Kaneko, K. Takahashi, M. Ogawa and S. Goto (1982). "The effects of temperature and pH on the growth of eight enteric and nine glucose non-fermenting species of gram-negative rods." *Microbiol Immunol* **26**(1): 15-24.
- Tsukahara, J., K. Mukaiyama, S. Okuda, S. Narita and H. Tokuda (2009). "Dissection of LolB function--lipoprotein binding, membrane targeting and incorporation of lipoproteins into lipid bilayers." *Febs J* **276**(16): 4496-504.
- Tzortzaki, E. G. V., E. ; Siafakas N. M. (2007). "Pulmonary surfactant." *Pneumon* **20**(4): 7.

-V-

- Valderrey, A. D., M. J. Pozuelo, P. A. Jimenez, M. D. Macia, A. Oliver and R. Rotger (2010). "Chronic colonization by *Pseudomonas aeruginosa* of patients with obstructive lung diseases: cystic fibrosis, bronchiectasis, and chronic obstructive pulmonary disease." *Diagn Microbiol Infect Dis* **68**(1): 20-7.
- Vale, R. D. (2000). "AAA proteins. Lords of the ring." *J Cell Biol* **150**(1): F13-9.
- Vallet, I., J. W. Olson, S. Lory, A. Lazdunski and A. Filloux (2001). "The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(12): 6911-6.
- Vallis, A. J., T. L. Yahr, J. T. Barbieri and D. W. Frank (1999). "Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions." *Infect Immun* **67**(2): 914-20.
- Van Delden, C. and B. H. Iglewski (1998). "Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections." *Emerg Infect Dis* **4**(4): 551-60.
- Vasil, M. L. (1986). "*Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology." *J Pediatr* **108**(5 Pt 2): 800-5.
- Veenendaal, A. K., C. Sundin and A. J. Blocker (2009). "Small-molecule type III secretion system inhibitors block assembly of the *Shigella* type III secretion." *J Bacteriol* **191**(2): 563-70.

- Ventre, I., A. L. Goodman, I. Vallet-Gely, P. Vasseur, C. Soscia, S. Molin, S. Bleves, A. Lazdunski, S. Lory and A. Filloux (2006). "Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(1): 171-6.
- Verove, J., C. Bernarde, Y. S. Bohn, F. Boulay, M. J. Rabiet, I. Attree and F. Cretin (2012). "Injection of *Pseudomonas aeruginosa* Exo toxins into host cells can be modulated by host factors at the level of translocon assembly and/or activity." *PLoS One* **7**(1): e30488.
- Viarre, V., E. Cascales, G. Ball, G. P. Michel, A. Filloux and R. Voulhoux (2009). "HxcQ liposecretin is self-piloted to the outer membrane by its N-terminal lipid anchor." *J Biol Chem* **284**(49): 33815-23.
- Voulhoux, R., M. P. Taupiac, M. Czjzek, B. Beaumelle and A. Filloux (2000). "Influence of deletions within domain II of exotoxin A on its extracellular secretion from *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **182**(14): 4051-8.

-W-

- Wagner, S., I. Sorg, M. Degiacomi, L. Journet, M. Dal Peraro and G. R. Cornelis (2009). "The helical content of the YscP molecular ruler determines the length of the *Yersinia* injectisome." *Mol Microbiol* **71**(3): 692-701.
- Wagner, S., M. Stenta, L. C. Metzger, M. Dal Peraro and G. R. Cornelis (2010). "Length control of the injectisome needle requires only one molecule of Yop secretion protein P (YscP)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(31): 13860-5.
- Waterman, M., G. H. Murdoch, R. M. Evans and M. G. Rosenfeld (1985). "Cyclic AMP regulation of eukaryotic gene transcription by two discrete molecular mechanisms." *Science* **229**(4710): 267-9.
- Watson, P. R., S. M. Paulin, A. P. Bland, P. W. Jones and T. S. Wallis (1995). "Characterization of intestinal invasion by *Salmonella typhimurium* and *Salmonella dublin* and effect of a mutation in the *invH* gene." *Infect Immun* **63**(7): 2743-54.
- Wiese, C., J. M. Hinz, R. S. Tebbs, P. B. Nham, S. S. Urbin, D. W. Collins, L. H. Thompson and D. Schild (2006). "Disparate requirements for the Walker A and B ATPase motifs of human RAD51D in homologous recombination." *Nucleic Acids Res* **34**(9): 2833-43.
- Wilharm, G., S. Dittmann, A. Schmid and J. Heesemann (2007). "On the role of specific chaperones, the specific ATPase, and the proton motive force in type III secretion." *Int J Med Microbiol* **297**(1): 27-36.
- Winsor, G. L., D. K. Lam, L. Fleming, R. Lo, M. D. Whiteside, N. Y. Yu, R. E. Hancock and F. S. Brinkman (2011). "*Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes." *Nucleic Acids Res* **39**(Database issue): D596-600.
- Woestyn, S., A. Allaoui, P. Wattiau and G. R. Cornelis (1994). "YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery." *J Bacteriol* **176**(6): 1561-9.
- Wolfgang, M. C., B. R. Kulasekara, X. Liang, D. Boyd, K. Wu, Q. Yang, C. G. Miyada and S. Lory (2003). "Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8484-9.
- Wolska, K., K. Zabielska and A. Jakubczak (2006). "Effect of neuraminidase on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human buccal epithelial cells. Inhibition of adhesion by monosaccharides." *Pol J Microbiol* **55**(1): 43-8.
- Wood, S. E., J. Jin and S. A. Lloyd (2008). "YscP and YscU switch the substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system by regulating export of the inner rod protein YscI." *J Bacteriol* **190**(12): 4252-62.

-Y-

- Yahr, T. L. and D. W. Frank (1994). "Transcriptional organization of the trans-regulatory locus which controls exoenzyme S synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **176**(13): 3832-38.
- Yakushi, T., K. Masuda, S. Narita, S. Matsuyama and H. Tokuda (2000). "A new ABC transporter mediating the detachment of lipid-modified proteins from membranes." *Nat Cell Biol* **2**(4): 212-8.
- Yang, H., Z. Shan, J. Kim, W. Wu, W. Lian, L. Zeng, L. Xing and S. Jin (2007). "Regulatory role of PopN and its interacting partners in type III secretion of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **189**(7): 2599-609.
- Yang, H. J., D. S. Wei, M. C. Li and L. J. Xing (2007). "[Type III secretion study of popN- mutant of *Pseudomonas aeruginosa* and proteases degradation]." *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* **23**(5): 846-51.
- Yip, C. K., T. G. Kimbrough, H. B. Felise, M. Vuckovic, N. A. Thomas, R. A. Pfuetzner, E. A. Frey, B. B. Finlay, S. I. Miller and N. C. Strynadka (2005). "Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly." *Nature* **435**(7042): 702-7.
- Yip, C. K. and N. C. Strynadka (2006). "New structural insights into the bacterial type III secretion system." *Trends Biochem Sci* **31**(4): 223-30.
- Young, V. M. (1977). *Pseudomonas aeruginosa: Ecological Aspects and Patient Colonization*, Books on Demand.

-Z-

- Zarivach, R., M. Vuckovic, W. Deng, B. B. Finlay and N. C. Strynadka (2007). "Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system." *Nat Struct Mol Biol* **14**(2): 131-7.
- Zenk, S. F., D. Stabat, J. L. Hodgkinson, A. K. Veenendaal, S. Johnson and A. J. Blocker (2007). "Identification of minor inner-membrane components of the *Shigella* type III secretion system 'needle complex'." *Microbiology* **153**(Pt 8): 2405-15.
- Zhu, H. T., S. J. ; Rice, S. ; Kjelleberg, S. ; Kumar, N. ; Read, R. W. ; Erickson P. ; Willcox M. D. P. (2002). "Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors by Furanones." *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
- Zhuo, H., K. Yang, S. V. Lynch, R. H. Dotson, D. V. Glidden, G. Singh, W. R. Webb, B. M. Elicker, O. Garcia, R. Brown, Y. Sawa, B. Misset and J. P. Wiener-Kronish (2008). "Increased mortality of ventilated patients with endotracheal *Pseudomonas aeruginosa* without clinical signs of infection." *Crit Care Med* **36**(9): 2495-503.

## Références bibliographiques

- Zigangirova, N. A., E. S. Zayakin, L. N. Kapotina, E. A. Kost, L. V. Didenko, D. Y. Davydova, J. P. Rumyantseva and A. L. Gintsburg (2012). "Development of Chlamydial Type III Secretion System Inhibitors for Suppression of Acute and Chronic Forms of Chlamydial Infection." *Acta Naturae* **4**(2): 87-97.
- Zulianello, L., C. Canard, T. Kohler, D. Caille, J. S. Lacroix and P. Meda (2006). "Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*." *Infect Immun* **74**(6): 3134-47.

# Etude de deux protéines du Système de Sécrétion de Type III de *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie à Gram négatif responsable d'infections nosocomiales, possède de nombreux facteurs de virulence lui permettant d'infecter ses hôtes. En particulier, le Système de Sécrétion de Type III (SST3) lui permet d'injecter des effecteurs directement dans le cytoplasme de la cellule cible eucaryote. Durant cette thèse, deux protéines du SST3 de *P. aeruginosa* ont été étudiées : l'ATPase PscN et la protéine ExsB.

Plusieurs approches ont été utilisées afin d'étudier l'ATPase PscN, indispensable à l'activité du SST3. Des mutations ponctuelles réalisées dans PscN conduisent à des souches de *P. aeruginosa* non cytotoxiques, et cet effet est dominant négatif. Une autre approche a permis l'obtention de fractions partiellement purifiées de l'ATPase PscN active, sous forme de grands complexes visualisés en microscopie électronique. Ces fractions contiennent également d'autres protéines du SST3, qui pourraient être des partenaires de PscN.

La protéine ExsB a été caractérisée pour la première fois. Après avoir vérifié son expression chez *P. aeruginosa*, son association à la membrane externe de la bactérie a été démontrée. Son rôle a ensuite été étudié par une analyse du phénotype d'une souche de *P. aeruginosa* dépourvue du gène *exsB*. Nous n'avons pas identifié d'activité de ExsB dans la régulation du SST3. Après avoir constaté l'implication de ExsB dans la virulence de la bactérie dans des modèles d'infections aiguës chez les animaux, son rôle dans l'activité du SST3 a été établi. Nous avons enfin pu montrer que ExsB a une activité de pilotine, car elle participe à l'assemblage de la sécrétine, le composant de la membrane externe du SST3.

**Mots-clés :** *Pseudomonas aeruginosa*, Système de Sécrétion de Type III, ATPase, pilotine

---

## Study of two proteins of *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System

*Pseudomonas aeruginosa*, a Gram negative bacterium responsible for nosocomial infections, exhibits numerous virulence factors to infect its hosts. In particular, the Type III Secretion System (T3SS) allows the injection of effectors directly into the host cell cytoplasm. This work focuses on the study of two proteins from the T3SS of *P. aeruginosa*: the ATPase PscN and the ExsB protein.

Several approaches were used to study the ATPase PscN, an enzyme essential for T3SS activity. Site-directed mutations, made on PscN, lead to non cytotoxic strains, and this effect is dominant negative. Another approach allowed the partial purification of active PscN, visualized as large complexes by electron microscopy. These partially purified samples also contain other T3SS proteins, which could interact with PscN.

The ExsB protein was characterized for the first time. After checking its expression in *P. aeruginosa*, its association with the outer membrane was shown. The phenotypic analysis of a strain lacking *exsB* gene gave insights into the role of this protein. We did not identified any function of ExsB in the T3SS regulation. After showing the involvement of ExsB in the bacterial virulence during acute animal infections, ExsB role in T3SS activity was established. Finally, we showed that ExsB has a pilotin activity as it participates in the assembly of the secretin, the outer membrane component of T3SS.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, Type III Secretion System, ATPase, pilotin